



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE INFECTOMICA Y PATOGENESIS
MOLECULAR**

**“Identificación de proteínas celulares que interaccionan con las proteínas
virales NS1 Y NS5 del virus dengue en células Huh-7”**

Tesis que presenta

M. en C. Margot Cervantes Salazar

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

En Infectómica y patogénesis molecular

Director de Tesis

Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres

México, D.F.

Noviembre, 2015.

Este trabajo se desarrolló en el departamento de Infectómica y Patogénesis molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados de Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) bajo la tutoría de la Dra. Rosa María del Ángel Núñez con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y del ICyTDF.

Número de becario 234163.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS
ÍNDICE DE TABLAS
LISTA DE ABREVIATURAS
RESUMEN
ABSTRACT

	Pág
I. INTRODUCCIÓN	
1.1 ANTECEDENTES GENERALES	
1.1.1 Epidemiología.....	1
1.1.2 Dengue en México.....	1
1.1.3 Dengue como enfermedad.....	2
1.1.4 Agente etiológico.....	3
1.1.4.1 Proteínas virales.....	3
1.1.4.2 Ciclo replicativo de DENV.....	5
1.2 ANTECEDENTES PARTICULARES	
1.2.1 Factores celulares involucrados en la replicación de DENV.....	6
1.2.2 Asociación de proteínas celulares con la proteína viral NS1.....	10
1.2.3 Asociación de proteínas celulares con la proteína viral NS5.....	13
II. JUSTIFICACIÓN	15
III. HIPOTESIS	16
IV. OBJETIVO GENERAL	16
V. OBJETIVOS PARTICULARES	16
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	17
6.1 Propagación del virus y cultivos celulares.....	17
6.1.1 Ensayo de placas líticas en células BHK-21.....	17
6.2 Preparación de extractos proteicos citoplasmáticos enriquecidos con membranas.....	18
6.2.1 Preparación de extractos proteicos nucleares.....	19
6.3 Preparación de bacterias <i>E. coli</i> DH5 α competentes.....	20
6.3.1 Transformación de bacterias <i>E. coli</i> DH5 α y BL-21* competentes por choque térmico.....	20
6.3.2 Purificación del plásmido pProExb-NS1 por lisis alcalina.....	21
6.4 Expresión de la proteína NS1 recombinante.....	21
6.4.1 Expresión de la proteína NS5 recombinante.....	22
6.4.2 Purificación y acoplamiento de la proteína NS1 recombinante a una columna de afinidad.....	22

6.4.3 Acoplamiento de la proteína NS5 recombinante a la resina NiNTA.....	23
6.5 Interacción de la proteína recombinante NS1 con el extracto citoplasmático enriquecido con proteínas de membrana.....	23
6.5.1 Interacción de la proteína recombinante NS5 con el extracto nuclear.....	24
6.5.2 Precipitación de proteínas con acetona.....	25
6.6 Inmunoprecipitación.....	25
6.7 Análisis de los datos obtenidos por espectrometría de masas.....	27
6.8 Cinética de infección en Células Huh-7 y Western blot.....	27
6.9 Inmunofluorescencias.....	28
6.10 Silenciamiento del gen de interés empleando siRNA.....	28
6.11 Viabilidad y metabolismo celular después del silenciamiento.....	29
6.11.1 Marcaje con [³⁵ S]-Meth.....	29
6.11.2 Tinción con nitrato de plata y azul de Coomassie (Bio-Safe).....	30
6.12 qRT-PCR y actividad de luciferasa.....	30
VII. RESULTADOS.....	31
7.1 AISLAR E IDENTIFICAR PROTEÍNAS CELULARES QUE INTERACCIONAN CON LAS PROTEÍNAS VIRALES NS5 Y NS1	
7.1.1 Proteínas celulares que interaccionan con la proteína no estructural 5 (NS5) de DENV en células Huh-7.....	31
7.1.2 Caracterización funcional de las proteínas celulares que interaccionan con NS5.....	34
7.1.2.1 La proteína NS5 colocaliza con las proteínas celulares eEf-1α, hnRNP y DDX5 en células Huh-7 infectadas.....	37
7.2 Proteínas celulares que interaccionan con NS1 en células Huh-7.....	43
7.2.1 Purificación de la proteína recombinante NS1.....	43
7.2.2 Proteínas celulares que interaccionan con NS1 Huh-7.....	46
7.2.3 Caracterización funcional de las proteínas celulares que interaccionan con NS1.....	51
7.3 La proteína NS1 interacciona con las proteínas celulares RPL18a, RPL18 y GAPDH en células Huh-7 infectadas.....	55
7.4 Las proteínas GAPDH, RPL18a y RPL18 no alteran su expresión durante la infección de DENV en células Huh-7.....	56
7.5 Silenciamiento de la proteína ribosomal RPL18.....	61
7.6 RPL18 es requerida durante la infección con DENV.....	63
VIII. DISCUSIÓN.....	67
IX. CONCLUSIÓN.....	75
X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	76
XI. APÉNDICE.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Mapa de la distribución global del mosquito <i>Aedes aegypti</i>	1
Figura 2. Panorama epidemiológico de fiebre y fiebre hemorrágica por Dengue en México 2014 -2015.....	2
Figura 3. Proteína NS5 recombinante acoplada a la cromatografía de afinidad.....	32
Figura 4. Obtención de proteínas celulares que interactúan con la proteína NS5r por cromatografía de afinidad.....	32
Figura 5. Localización sub-celular de las proteínas celulares que interactúan con NS5 identificadas por espectrometría de masas.....	35
Figura 6. Red de interacción proteína-proteína de las proteínas identificadas que interactúan con NS5.....	36
Figura 7. Localización sub-celular de las proteínas hnRNP F y DDX5 en células infectadas con DENV2.....	38
Figura 8. Localización sub-celular de la proteína DDX5 en células HUH-7 infectadas con DENV 2.....	39
Figura 9. Localización sub-celular de la proteína NS5 a diferentes tiempos post-infección en células HUH-7.....	40
Figura 10. Viabilidad de ivermectina.....	41
Figura 11. Localización subcelular de la proteína DDX5 en células tratadas con ivermectina.....	42
Figura 12. Producción de la proteína recombinante.....	44
Figura 13. Purificación de la proteína NS1r por cromatografía de afinidad.....	45
Figura 14. Control negativo de la cromatografía de afinidad.....	46
Figura 15. Obtención de proteínas celulares que interactúan con la proteína NS1r por cromatografía de afinidad.....	48
Figura 16. Localización sub-celular de las proteínas celulares que interactúan con NS1 identificadas por espectrometría de masa.....	52
Figura 17. Localización sub-celular de las proteínas celulares que interactúan con NS1 identificadas por espectrometría de masas.....	53
Figura 18. Red de interacción proteína-proteína de las proteínas identificadas que interactúan con NS1.....	54
Figura 19. NS1 interactúa con las proteínas celulares GAPDH, RPL18a y RPL18.....	56
Figura 20. Niveles de expresión de las proteínas celulares GAPDH, RPL18a y RPL18 en células infectadas.....	59
Figura 21. Localización sub-celular de GAPDH y RPL18 en células infectadas con DENV... ..	60
Figura 22. Silenciamiento de la proteína ribosomal RPL18.....	62
Figura 23. El silenciamiento de la proteína ribosomal RPL18 no altera la viabilidad ni el metabolismo celular.....	63
Figura 24. El silenciamiento de la proteína ribosomal RPL18 inhibe la infección por DENV.....	65
Figura 25. El silenciamiento de la proteína ribosomal RPL18 inhibe la traducción/replicación de DENV.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas aisladas e identificadas por espectrometría de masas (Maldi-ToF) que interaccionan con NS5.....	33
Tabla 2. Clasificación biológica de las proteínas celulares que interaccionan con NS5.....	34
Tabla 3. Proteínas aisladas e identificadas por espectrometría de masas (Maldi-ToF).....	50
Tabla 4. Clasificación biológica de las proteínas celulares que interaccionan con NS1.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

Ab	anticuerpo
AbM	Anticuerpo monoclonal
ADE	Antibody dependent enhancement
ATP	Adenosin-5'-trifosfato
DENV	Dengue virus
DF	Fiebre por dengue
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetracético
EF-1α	Factor de alargamiento 1- α
FHD	Fiebre hemorrágica por dengue
hnRNPA	Ribonucleoproteína heterogena nuclear
IFN	Interferón
IL	interleucina
Kb	Kilobase
kDa	Kilodaltons
L-18	Ribonucleoproteína 18
MOI	Multiplicidad de infección
NS	Proteína no estructurales
NS1	Proteína no estructural 1
NS1s	Proteína no estructural 1 soluble
NS5	Proteína no estructural 5
OD	Densidad óptica
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PDI	Proteína disulfuro isomerasa
PFU	Unidad formadora de placa
PTB	Proteína de unión al tracto de polipirimidina
RE	Retículo endoplasmico
RNA	Acido ribonucleico
RNA_{dc}	RNA de doble cadena
SCD	Síndrome de choque por dengue
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TA	Temperatura ambiente
UTR	Región no traducida
VHC	Virus de la hepatitis C
WHO	Organización mundial de la salud
WNV	Virus del oeste del Nilo

RESUMEN

El agente causal de esta enfermedad es el virus del dengue, miembro del [género](#) *Flavivirus* de [la familia](#) *Flaviviridae*. El genoma viral consta de una molécula de RNA de polaridad positiva el cual codifica para 3 proteínas estructurales y 7 proteínas no estructurales. Dentro de estas últimas, se encuentran las proteínas NS1 y NS5 ambas claves para la replicación viral. NS1 tiene un peso molecular de 45 kDa y se encuentra en forma monomérica en el citoplasma celular asociada a complejos replicativos, de manera dimerica anclada a la membrana celular y hexamérica que es secretada al medio o plasma. Por su parte, la proteína NS5 presenta un peso de 105 kDa, es la polimerasa viral encargada de replicar el material genético y tiene además funciones de metiltransferasa. NS5 se localiza en la región perinuclear; sin embargo, también es translocada de manera abundante al núcleo, donde no se sabe la función que ahí desempeña. Dada la austeridad genética que presentan los virus, éstos requieren no solo de proteínas virales sino también de factores y estructuras celulares para poder completar su ciclo replicativo. Usando 2 metodologías diferentes pero complementarias entre sí (cromatografía de afinidad e inmunoprecipitación) identificamos 64 proteínas celulares que interactúan con la proteína viral NS1 y 36 que interactúan con NS5. Dentro de las proteínas que identificamos que interactúan con NS5 se encuentra la proteína DDX5 (helicasa de tipo 2) NS5 es capaz de trasladarse al núcleo y colocalizar con ella a las 12 hpi. Sin embargo, esta proteína sale del núcleo a las 24 hpi. Al tratar las células con Ivermectina (fármaco inhibidor del transporte a través del mecanismo α/β importinas) NS5 se localiza en el citoplasma y la proteína DDX5 en el núcleo lo cual podría sugerir la posible participación de NS5 en el transporte de proteínas nucleares hacia el citoplasma. Por otro lado una de las proteínas celulares que interactúan con NS1 es la proteína ribosomal 18 (RPL18) el silenciamiento de esta proteína no afecta la viabilidad ni el metabolismo celular pero el rendimiento viral se ve comprometido así como la síntesis de RNA viral y la cantidad de NS1 secretada al sobrenadante lo cual sugiere la posible participación de la proteína RPL18 en el ciclo replicativo de dengue.

ABSTRACT

Dengue is the most important mosquito-borne viral disease in the world. Given the austerity of dengue virus (DENV) genome, it uses cellular molecules and structures to enter into the cell, translate and replicate its genome and to produce viral progenie. Different strategies have been used to identify cell proteins involved in the viral replicative cycle. NS1 is a multifunctional playing important role in viral replication and pathogenesis while NS5 is the RNA dependent RNA polymerase. The identification of cellular proteins that interact with NS1 and NS5 may be help in further understanding the fuctions of both proteins.

In this work we isolate cellular proteins from DENV infected human hepatic cells (Huh-7) that interact with NS1 using an affinity chromatography with a His-tag recombinant NS1 protein and by an immunoprecipitation assays, using a polyclonal anti-NS1 antibody. Cell proteins that interact directly or indirectly with NS1 or NS5 were identified by MALDI ToF MS/MS. A total of 64 proteins were identified belonging to different functional including ribosomal, histone and cytoskeleton proteins. The subcellular location and expression leves during DENV infection of the identified ribosomal proteins RPS3a, RPL7, RPL18, RPL18a plus GAPDH was determined. None of these proteins changed their expression levels during DENV infection; however, RPL18 was found to redistribute to the perinuclear region of infected cells after 48 hpi. The interaction between NS1 and RPL18, RPL18a and GAPDH was confirmed by co-immunoprecipitation assay. Silencing of the RPL18 by siRNA techniques does not affect cell translation efficiency or viability, jet it reduce significantly viral translation and replication as well as vial yield. In addition, we identified 36 proteins that interact with NS5. This result strongly suggests that the RPL18 is required during DENV replicative cycle.

I. INTRODUCCIÓN

1.0 ANTECEDENTES GENERALES

1.1.1 Epidemiología

En los últimos 50 años se ha observado un aumento dramático en la distribución geográfica de los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* y un consecuente incremento en la transmisión de arbovirus (virus transmitidos por artrópodos) como el virus del dengue (DENV). Dengue es la infección arboviral humana más prevalente en el mundo causando 100 millones de infecciones anuales alrededor del mundo (Kraemer et al. 2015; Chua et al. 2005)

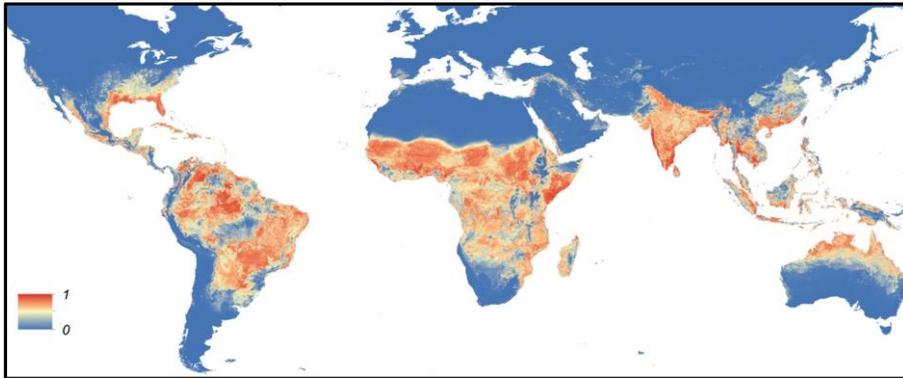


Figura 1. Mapa de la distribución global del mosquito *Aedes aegypti*. El mapa representa la probabilidad de aparición (azul 0 y rojo 1) del mosquito en el mundo. DOI: 10.7554/eLIFE.08347.009 <http://elifesciences.org/content/4/e08347.full.pdf>.

1.1.2 Dengue en México

La estructura del Sistema Nacional de Salud y la Secretaría de Salud, correspondiente a la dirección general de epidemiología (DGAE) y el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) reportan un incremento del 1.6% en los casos confirmados, esto al comparar el comportamiento de los casos ocurridos en la misma fecha en el 2014. El 51% de los casos confirmados ocurrieron en los estados de Guerrero, Veracruz, Chiapas, Colima y Sonora (Figura 2). (Dirección General de Epidemiología 2015).

DATOS	2014	2015	% de variación
FHD confirmados	2,416	1,627	-32.7
FD confirmados	5,723	6,642	16.1
Confirmados	8,139	8,269	1.6
Defunciones	28	11	-60.7
Letalidad**	1.16	0.68	-41.7

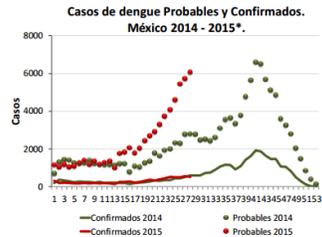


Figura 2. Panorama epidemiológico de fiebre y fiebre hemorrágica por Dengue en México 2014 -2015. Estudio realizado hasta la semana 50 del 2014 y hasta la semana 30 del 2015. En la tabla se detalla el total de casos y la clasificación de acuerdo al cuadro clínico presentado por el paciente.

http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/panodengue/PANORAMAS_2015/Pano_dengue_s em_30_2015.pdf

1.1.3 El Dengue como enfermedad

La infección por DENV puede pasar desapercibida o generar una enfermedad febril auto-limitada conocida como fiebre por dengue (FD), la cual se caracteriza por fiebre de alto grado, artralgia (dolor en las articulaciones), dolor de cabeza, dolor retro-orbital, vomito, náuseas, leucopenia y mialgia (Alcaraz-Estrada et al., 2010). En un cierto número de casos, la infección puede tener signos más severos y generar lo que se conoce como fiebre del dengue hemorrágico (FHD) y el síndrome de choque por dengue (SCD) (Perera and Kuhn 2008). La FHD se distingue de FD porque hay pérdida del plasma, trombocitopenia (bajo recuento de plaquetas), aparición de pequeñas petequias en el cuerpo, sangrado de nariz, tracto gastrointestinal y el periodo febril puede durar de 2 a 7 días (Alcaraz-Estrada et al., 2010). La excesiva pérdida de plasma causa hemoconcentración ocasionando una baja importante en la presión y en el volumen sanguíneo lo que desencadena el SCD y el paciente puede morir por choque hipovolémico (Alcaraz-Estrada et al., 2010; Srikiatkachorn 2009; Martina et al., 2009).

Se ha sugerido que un factor de riesgo para la FHD y el SCD es una infección secundaria principalmente debido a un proceso conocido como aumento de la

infección dependiente de anticuerpos (ADE por sus siglas en inglés) (Navarro-Sánchez, Desprès, y Cedillo-Barrón 2005; Malet et al. 2008).

1.1.4 Agente etiológico

DENV es miembro de la familia *Flaviviridae* del género *Flavivirus*. DENV tiene un diámetro de 50 nm en estado maduro y 60 nm cuando se encuentra como virión inmaduro (Ludert et al. 2008) . El genoma viral es una molécula de RNA de cadena sencilla de polaridad positiva que codifica para tres proteínas estructurales: la proteína de la cápside (C) y las dos proteínas presentes en la membrana viral, membrana (M) y la de la envoltura (E). La glicoproteína E es la proteína viral estructural más expuesta en la superficie de la partícula. El genoma viral también codifica para siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B y NS5) las cuales están involucradas en la replicación viral (Perera y Kuhn 2008). El genoma viral consiste en una sola cadena de RNA de polaridad positiva de alrededor de 10.7 Kb, la cual contiene en el extremo 5' una estructura "cap" tipo I y en el extremo 3' carece de la cola de poli A, característica de los RNAm celulares. El único marco de lectura abierto del genoma, de aproximadamente 10 Kb, está flanqueado por dos regiones no traducidas (UTR) de 101 y 384 nt de largo respectivamente (Perera y Kuhn 2008) las cuales son altamente conservadas en los *Flavivirus* y contienen secuencias señales que actúan en *cis* para modular la replicación viral. Las UTR contienen estructuras de tallo y burbuja conservadas, tanto en la región terminal 5' como en la 3' (García-Montalvo et al. 2004; Zhang et al. 2004; Villordo y Gamarnik 2009).

1.1.4.1 Proteínas virales

a) Proteínas estructurales

El genoma viral debe traducirse en el citoplasma celular en los ribosomas adosados al RE generando una poliproteína, la cual es procesada por proteasas virales y celulares. Las proteínas codificadas en el extremo amino terminal son las proteínas estructurales, en donde una de ellas, la proteína E es glicosilada por la glicosiltransferasa celular en el aparato de Golgi (Zhang et al. 2004; Perera and

Kuhn 2008). La morfogénesis viral se inicia en el retículo endoplásmico y el último paso de maduración ocurre dentro de las vesículas exocíticas. Bajo la proteína E, también anclada a la membrana viral, se encuentra la proteína M, la cual se sintetiza como un precursor llamado prM/M (Perera and Kuhn 2008; Zhang et al. 2004).

b) Proteínas no estructurales

Las proteínas no estructurales participan en la replicación viral, en la patogénesis viral y en el ensamblaje del virión. NS3 y NS5 poseen la actividad enzimática requerida para sintetizar el cap y para llevar a cabo la replicación del genoma viral (Brett D. Lindenbach y Rice 2003).

La proteína **NS3** tiene varios dominios catalíticos incluyendo el de serin-proteasa, el cual requiere como cofactor a **NS2B** para el procesamiento de la poli proteína. También presenta un dominio de unión a trifosfato para llevar a cabo la función de helicasa que es necesaria para la síntesis de RNA viral. Se ha observado que NS3 es capaz de interactuar con receptores nucleares los cuales modulan el tráfico intracelular entre el RE y el Golgi causando una inducción de estructuras tipo membrana en el proceso de infección. Las proteínas virales menos caracterizadas son las pequeñas proteínas hidrofóbicas **NS2A, NS4A y NS4B**, las cuales se encuentran presentes en el sitio de replicación y ensamblaje del virión (Clyde et al. 2006). La proteína **NS1** es expresada en tres formas: la forma monomérica se encuentra en el RE e interactúa con el complejo de replicación viral, la forma dimerica se encuentra anclada a la membrana celular y la forma hexamérica que es secretada al líquido extracelular (sNS1)(Chua et al. 2005). Una de las modificaciones pos-traduccionales de esta proteína es la glicosilación en dos sitios diferentes de la molécula. Al parecer, estas glicosilaciones son necesarias para que el virus se replique en células de mosquito. Recientemente, la sNS1 se ha sugerido que tiene un papel muy importante en la patogénesis de la enfermedad (Clyde et al. 2006).

Con formato: Sin Superíndice / Subíndice

La Proteína NS5 (metil-transferasa / polimerasa) es la más grande de las proteínas virales pues tiene aproximadamente 900 aminoácidos y es también la proteína más conservada entre los *Flavivirus*. El papel principal de ésta proteína es en la replicación del material genético viral ya que contiene la actividad enzimática necesaria para la adición del cap y para la síntesis de RNA a partir del RNA viral. Estas actividades están presentes en diferentes regiones de la proteína, ya que en el extremo N-terminal está codificada la actividad de metil-transferasa (S-adenosil-L-metionina-dependiente) (Poch et al. 1989) mientras que la actividad de RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) está presente en el extremo C-terminal (Rice et al. 1985; Poch et al. 1989; Koonin 1991). En la región N-terminal también tiene un dominio de unión a GTP, el cual es indispensable para realizar las dos reacciones de metilación N7 y 2'O requeridas para la formación del Cap (Egloff et al. 2007; Koonin 1993).

1.1.4.2 Ciclo replicativo de DENV

El primer paso en el ciclo viral es la unión del virus a la superficie de la célula blanco. Esta interacción está mediada por la proteína E y el receptor localizado en la superficie de la célula huésped. Se han descrito una gran cantidad de moléculas que pueden actuar como receptor para DENV, sin embargo, todas estas interacciones convergen en que el virus se internaliza por endocitosis mediada por receptor (Bressanelli et al. 2004). La fusión con la membrana del endosoma es inicialmente inducida por el pH ácido (Heinz et al. 2004) del endosoma el cual lleva a un cambio conformacional en la proteína E, que finalmente fusiona ambas membranas y permite la liberación de la nucleocapside y del RNA viral al citoplasma. El RNA es primeramente traducido en una sola poliproteína de alrededor de 3388 aminoácidos (Rodenhuis et al. 2010; Zhang et al. 2004; Bressanelli et al. 2004; Zhang et al. 2003) la cual por la presencia de un péptido señal es traslocada a la membrana del RE (retículo endoplasmático) donde es procesada por proteasas virales y celulares para dar origen a las 10 proteínas virales maduras. Una vez que hay suficiente proteína viral, el RNA de polaridad positiva se copia a un RNA de polaridad negativa el cual a su vez se replica para

generar muchas moléculas de RNA de polaridad positiva. La proteína C empaqueta el RNAv (RNA viral) recién sintetizado para dar origen a la nucleocápside que, sigue su viaje a través de la vía secretoria del RE en donde adquiere la envoltura y a las proteínas estructurales prM y E. Interesantemente, cuando el virión inmaduro llega a la red del trans-Golgi encuentra nuevamente un pH ácido (5.8-6.0) y la actividad de la furina, la cual procesa la proteína precursora de la proteína M (prM). Este procesamiento de prM lleva a la formación de virus maduros que son capaces de infectar las células vecinas (Stiasny y Heinz 2006; Rodenhuis et al. 2010).

1.2 ANTECEDENTES PARTICULARES

1.2.1. Factores celulares involucrados en la replicación de DENV

Dada la austeridad genética de los virus, estos requieren no solo de proteínas virales sino también de factores y estructuras celulares para unirse, entrar, traducirse, replicarse y ensamblarse dentro de la célula a la que infectan. Estos factores y estructuras celulares pueden participar en el ciclo replicativo viral realizando la función que normalmente realizan en la célula o bien, desempeñar una nueva función y con ello favorecer o bloquear algún paso en el ciclo viral (Yang et al. 2009). A nivel de entrada se ha descrito que DENV entra a la célula por endocitosis mediada por clatrina, por tanto, moléculas como clatrina, componentes de endosomas tempranos y tardíos, moléculas como Rab5, Rab7 y la ATPasa vacuolar al igual que componentes del citoesqueleto como actina y tubulina son necesarios para la internalización (Duan et al. 2008; Krishnan et al. 2007). La necesidad de estos componentes ha sido confirmada mediante un screening por silenciamiento de genes celulares (Yamasaki et al. 2007). En los últimos años, ha crecido el interés de diversos grupos de investigación por conocer algunos de los elementos celulares que favorecen la replicación de diversos virus. Por ejemplo, Rotwell y colaboradores en el 2009 describió que distintos siRNA dirigidos contra enzimas implicadas en la síntesis de colesterol, inhibían la replicación viral, sugiriendo que el colesterol era necesario para este

proceso (Rothwell et al. 2009). Otros autores, usando estrategias diferentes al silenciamiento y más bien basados en el uso de fármacos que inhiben síntesis de colesterol o la formación de microdominios membranales también encontraron que la presencia de colesterol es importante en la entrada y la replicación viral (Ceballos-Olvera et al. 2010; Rothwell et al. 2009).

Se sabe que los rafts lipídicos microdominios membranales ricos en colesterol y esfingolípidos que son capaces de incorporar o excluir proteínas de manera selectiva en la membrana celular en eventos celulares, como: traducción de señales, endocitosis, transcitosis y homeostasis del colesterol, son usados durante el ciclo replicativo de DENV. Otros virus como el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y virus Epstein-Bar también explotan su asociación con los rafts lipídicos en la entrada a la célula blanco o para evadir la respuesta inmune (Noisakran, Dechtawewat, et al. 2008). También a nivel de citoesqueleto se ha visto que la interacción con el virus induce rearrreglos del citoesqueleto que involucran la participación de pequeñas GTPasas como Rac-1 (Wang et al. 2010).

Otra proteína que se encuentra sobre-expresada en células endoteliales expuestas a DENV, es la proteína X que interactúa con el gen 2 relacionado a la apoptosis. Esta proteína se encuentra relacionada con el proceso de endocitosis mediada por receptor y en el metabolismo celular, por tanto podría participar en la entrada viral (Pattanakitsakul et al. 2010). En estudios en donde se emplea siRNA y proteómica se han identificado factores celulares que son importantes en el proceso replicativo viral. Uno de ellos es el sistema ubiquitin-proteasoma (USP) el cual se le ha relacionado en el proceso de replicación viral ya que el silenciamiento reduce de manera significativa la producción de partículas virales en algunos flavivirus como DENV, WNV y YFV. Para el caso de otros virus como en Citomegalovirus, herpes virus y virus Epstein Barr evaden la respuesta inmune del huésped alterando el procesamiento de las moléculas del MHC a través del proteasoma, otro ejemplo es Papiloma virus ya que la proteína E6 se asocia a la ubiquitin-ligasa para favorecer la degradación de p53 y prevenir la apoptosis (Nag y Finley 2012).

Otra manera de buscar factores que participan en la replicación viral ha sido estudiar los cambios diferenciales en la expresión de proteínas celulares cuando las células son expuestas al virus. Una de las proteínas identificadas en la infección por DENV es la ribonucleoproteína heterogénea nuclear A (hnRNPA), la cual tiene un papel importante en el procesamiento del RNA, incluyendo regulación de la traducción, poliadenilación, splicing del RNA y en la homeostasis celular (Kanlaya et al. 2010).

Recientemente también se ha descrito que la proteína heterogénea nuclear K pudiera estar participando en el ciclo replicativo de DENV debido a que esta proteína es capaz de salir del núcleo en las células infectadas mientras que en las células no infectadas se mantiene en el núcleo (Brunetti, Scolaro, y Castilla 2015a). Adicionalmente, K.P. Mishra y cols en el 2011 identificaron la sobre expresión de 2 proteínas en los extractos de células infectadas. Al hacer la identificación por espectrometría de masas encontraron a un miembro más de la familia de hnRNP en la forma H (hnRNP-H) además también se identificó a la proteína disulfuro isomerasa (PDIA3) la cual es una proteína residente del retículo endoplasmico cuya función de chaperona permite el correcto plegamiento de las proteínas celulares. Esta proteína ya había sido identificada que se une al RNA de polaridad negativa sugiriendo que estas proteínas pueden ayudar a la multiplicación de DENV (Agis-Juárez et al. 2009).

En el 2010 Rattiyaporn y cols., reportaron la interacción de vimetina con hnRNPs en células infectadas con DENV-2. La vimetina es un componente de los filamentos intermedios involucrados en la regulación de la forma celular, migración, tráfico vesicular y mitosis. Se sabe que DENV aumenta la expresión de vimetina al igual que de la hnRNPs, por tanto, podría pensarse que tienen un papel en la replicación viral, sin embargo, el papel que juegan estas dos proteínas en asociación con proteínas virales no es claro (Krishnan et al. 2007). Aunque existen diferentes estrategias para identificar proteínas y componentes celulares implicados en el ciclo replicativo viral, algunas de ellas, están más dirigidas a encontrar moléculas que participan directamente en la replicación del genoma.

Una de estas estrategias ha sido identificar proteínas que se unen al RNA viral. Esto debido a que en varios virus de RNA de cadena sencilla de polaridad (+), para llevar a cabo la replicación, requieren de algunos elementos estructurales localizados en las UTR 5' y 3' que interactúan con proteínas virales y/o celulares (Yocupicio-Monroy et al. 2003; De Nova-Ocampo et al., 2002). En el caso de DENV, se ha descrito que el RNA viral de polaridad positiva interactúa con la proteína La, la proteína de unión al tracto de polirimidina (PTB), el factor de alargamiento 1- α (EF-1 α), la proteína de unión a la caja Y (YB-1), la proteína heterogénea nuclear (hnRNPs), la proteína de unión poli(A) (PABP), la proteína disulfuro isomerasa (PDI) y la proteína calreticulina. Aunque la función específica de estas proteínas celulares en el proceso infeccioso no es claro, sí se sabe que YB-1 y La son moduladores negativos, mientras PTB es un modulador positivo (Agis-Juárez et al. 2009). La función del factor EF-1 α no se ha descrito para DENV, pero sí para el virus del Oeste del Nilo (WNV) en donde se une a la 3'UTR, favoreciendo la replicación viral, como ocurre con el virus de la estomatitis vesicular (Blackwell y Brinton 1997).

Otra forma de identificar factores celulares importantes en la replicación viral, es analizando la interacción de proteínas virales con proteínas o componentes celulares. Por ejemplo, la proteína E, principal componente de la superficie viral, interactúa directamente con proteínas celulares chaperonas como Hsp90, Hsp70, Grp78 o con receptores como el de laminina y lectinas de manosa y DC-SIGN durante la entrada viral (Chavez-Salinas et al. 2008; Wati et al. 2009; Thepparit y Smith 2004; Sakoonwatanyoo et al. 2006) y con chaperonas residentes del RE como proteína de unión (BiP), calreticulina y calnexina para la producción de partículas virales infecciosas (Limjindaporn et al. 2009). Por otro lado, se sabe que en el proceso de replicación y morfogénesis viral la proteína C debe asociarse al RNA. La proteína C se asocia a unos organelos derivados del RE conocidos como lipid droplets (gotitas de grasa), los cuales contienen una envoltura de lípidos neutros envueltos por una capa de fosfolípidos y poseen contenido variable de proteínas. La asociación de la proteína C a las lipid droplets es indispensable en la morfogénesis de DENV (Colpitts et al. 2011).

De manera paralela, también se ha estudiado la proteómica en células de mosquitos con el objetivo de encontrar posibles blancos terapéuticos o hacer modificaciones genéticas para bloquear la infección por DENV en el mosquito (Guo et al. 2010). Por espectrometría de masas identificaron a una proteína tipo tubulina de 45 kDa la cual es capaz de interactuar con componentes virales sugiriendo que pudiera tener un papel importante en el ensamble y transporte del virión a medio extracelular (Chee y AbuBakar 2004). Mediante bioinformática se identificaron 283 factores de susceptibilidad y 22 de resistencia a la infección por WNV. El silenciamiento dirigido contra los factores requeridos por WNV también afecta la infección por DENV sugiriendo que tienen como blanco proteínas en común del huésped para ser usadas a su favor, aunque estos causen cuadros clínicos completamente diferentes (Guo et al. 2010; Koonin 1993; Koonin 1991).

1.2.2 Asociación de proteínas celulares con la proteína viral NS1

La glicoproteína no estructural NS1, cuyo peso molecular es de 45 a 55 kDa dependiendo del grado de glicosilación, es una proteína multifuncional pues se ha implicado en la formación de los complejos de replicación del RNA viral por su localización en la región perinuclear del RE, además de que se encuentra dimerizada anclada en la membrana celular en la superficie de la célula, en donde al parecer participa en la evasión de la respuesta inmune del huésped. La proteína también es secretada como un hexámero. A pesar de que no es clara su participación extracelular se sugieren que es secretada con la finalidad de fijar complemento. Recientemente se ha descrito que la proteína NS1 hexamérica posee características y composición muy parecidas a la que presenta la lipoproteína de alta densidad HDL (por sus siglas en inglés High density lipoprotein) (Gutsche et al. 2011; Clyde et al. 2006).

Debido a la presencia en distintos compartimentos celulares y a la capacidad de ser secretada y a la habilidad para unir complemento, se cree que esta proteína es importante en el proceso infeccioso y patológico de DENV. Al respecto, Jia-En Chua et al. 2005 proponen que la proteína NS1 es la responsable de disparar los niveles de TNF- α en células dendríticas, la cual es una citosina importante en los

procesos inflamatorios y en la apertura de las uniones estrechas. Esta apertura estaría directamente relacionada con la fuga plasmática, característica del DHF. Los tiempos de secreción de NS1 también coinciden con la viremia, y no solo eso, sino que pacientes con DHF tienen una mayor cantidad de NS1 en suero que pacientes con DF, apoyando aún más su papel en la patogenia de la enfermedad (Chua et al. 2005).

En estudios recientes se observó que la proteína NS1 tiene dos sitios importantes de glicosilación en la posición Asn130 y Asn207 los cuales son requeridas para una eficiente secreción de la proteína en las células infectadas. Estos sitios son conservados en los cuatro serotipos por lo que se ha sugerido la posibilidad de la glicosilación sea importante en la patogénesis de la enfermedad. Más aún estos sitios de glicosilación también son requeridos en la replicación viral (Rozen-Gagnon et al. 2012; Tajima et al. 2008). La glicosilación en el sitio Asn130 es indispensable para el ciclo replicativo viral, pues si se inducen mutaciones en este sitio la producción viral se reduce considerablemente en células BHK-21 y C6/36 (Pryor y Wright 1994).

A pesar del gran interés que ha despertado el estudio de NS1, aún hay aspectos por descifrar. Uno de ellos, es que dirige a la proteína a los distintos destinos y a que estructuras se asocia. Noisakran (2008) encontraron que la proteína NS1 de DENV se asociaba con los rafts lipídicos durante la infección viral y no solo eso, sino que además co-localiza con proteínas que se sabe que se anclan a rafts lipídicos (CD-55). Sin embargo, en células transfectadas con la proteína NS1 de DENV-2, observan que solo una pequeña proporción de NS1 se asocia a rafts, sugiriendo que hay elementos ajenos a la proteína que inducen su localización en rafts (Dechtawewat et al. 2008).

En ese mismo orden de ideas, Poh et al. (2012) sugieren que el colesterol y ácidos grasos tienen efecto en la replicación ya que ambos lípidos son requeridos para generar estructuras membranosas las cuales son necesarias para mantener la integridad de los complejos replicativos (Poh et al. 2012).

Una forma de poder conocer algunas de las funciones de NS1, sería conociendo las proteínas a las que se asocia en los distintos compartimentos celulares, en distintos momentos de la infección.

Algunos estudios proponen que la forma intracelular participa principalmente en el proceso de replicación y maduración viral ya que se sabe que esta proteína es capaz de colocalizar con el RNAdc (RNA de doble cadena) (Heaton et al. 2010). Noisakran et al. (2008) por co-inmuprecipitación y espectrometría de masas aisló e identificó proteínas de la familia de las ribonucleoproteínas heterogeneonucleares que interactúan con NS1 específicamente las isoformas C1/C2 (hnRNP C1/C2) las cuales son importantes en el procesamiento del RNAm en el ciclo celular manteniendo la homeostasis. Con este hallazgo proponen que la proteína NS1 intracelular se asocia con proteínas celulares para favorecer el tráfico de proteínas y promover el micro-ambiente favorable para llevar a cabo el proceso de replicación viral (Noisakran et al. 2008).

Chua et al. (2005), por sistema de doble híbrido identificaron que la proteína NS1 era capaz de interactuar con la proteína STAT-3 la cual es importante en la vía de señalización para la producción de citocinas pro-inflamatorias. Por otro lado, Kurosu et al. (2007) mediante cromatografía de afinidad aislaron una proteína presente en suero de pacientes infectados con dengue y mediante espectrometría de masas identificó que se trataba de la lipoproteína clusterina la cual interesantemente se sabe que evita que se lleve el complejo de ataque a la membrana a través del complemento, por lo cual apoya la idea que la proteína NS1 es uno de los tantos agentes causales de la fuga de plasma en los pacientes que presentan FHD. A este respecto, reciente se ha identificado que esta proteína es capaz de interactuar con factores de coagulación pudiendo alterar las vías de activación de la cascada de coagulación. Lin et al. (2011), empleando cromatografía de afinidad y espectrometría de masas identificaron que la proteína NS1 se asocia con protombina y trombina en suero de pacientes infectados con DENV además también demostraron que la proteína NS1 inhibe la actividad del factor Xa el cual es el encargado de activar la protombina en trombina y dar inicio

la cascada de coagulación, lo que sugiere que en el plasma de pacientes infectados NS1 puede tener este efecto causando el FDH (Lin et al. 2012).

1.2.3 Asociación de proteínas celulares con la proteína viral NS5

En los últimos años gran cantidad de evidencia indica que la replicación de los *Flavivirus* ocurre en la región perinuclear en asociación con el RE. La enzima central en el proceso de replicación de DENV es la RNA polimerasa dependiente de RNA o NS5, la cual tiene peso molecular de 105 kDa y consta de 900 aminoácidos (Malet et al. 2008; Mosso et al. 2008; Chua et al. 2005). Esta proteína tiene tres dominios, el de RNA polimerasa, metiltransferasa y guaniltransferasa, necesarios para la síntesis de las nuevas cadenas de RNA y la adición de la estructura “cap” tipo I respectivamente. A pesar de lo que podría esperarse de la proteína NS5, ésta se une a la 5’UTR y no a la 3’UTR, que es el sitio en donde la síntesis de RNA debe comenzar. Esto no afecta la eficiencia del proceso pues debido a que el RNA genómico debe circularizarse para poderse replicar, los extremos 5’ y 3’UTR se encuentran adyacentes, así la polimerasa al unirse al extremo 5’UTR solo deberá moverse al extremo 3’ adyacente a su sitio de unión (Gebhard et al. 2011). Un hecho que llama la atención de ésta proteína es que a pesar de que las dos funciones principales de síntesis de RNA y de adición de “cap”, deben realizarse en el RE, ésta se localiza en gran cantidad en el núcleo de las células infectadas. A este respecto, Pryor et al. 2007 encontraron secuencias de localización nuclear presentes en la región del interdomino de la NS5 de DENV-2, las cuales son indispensables para el transporte de la proteína NS5 al núcleo. El transporte de NS5 al núcleo se lleva a cabo a través de la importina $\alpha\beta$, en donde ambas α y β son importantes pero solo la α es indispensable. Curiosamente, cuando se hicieron mutaciones en el agrupamiento de lisinas presentes en el sitio de unión de la importina $\alpha\beta$, se observó disminución drástica en la producción de partículas virales infectivas, sugiriendo que la presencia de NS5 en el núcleo es importante durante la replicación viral o bien que las mutaciones generadas afectan la actividad de polimerasa o metil-transferasa.

Alternativamente, la región rica en lisinas de NS5 puede tener un papel en la morfogénesis viral (Pryor et al. 2007) .

Por otro lado, también se ha logrado identificar que la exportina utilizada por NS5 para salir del núcleo, es la exportina CRM1 por (Rawlinson et al. 2009). La inhibición de CRM1 durante la infección por DEN-2 conduce a un incremento de NS5 en el núcleo y con ello una reducción en la inducción de IL-8 aumentando la producción viral. Este hecho nuevamente apunta a que durante la estancia en el núcleo de NS5, ésta modula de manera directa o indirecta la expresión de interleucinas como IL-8. En este sentido, no se sabe si NS5 pudiera actuar como factor de transcripción o bien activar el funcionamiento de alguno (Rawlinson et al. 2009).

También se le ha relacionado a la proteína NS5 con la evasión del sistema inmune alterando la vía Jack/STAT. Ashour et al. (2009) describe que la polimerasa viral es antagonista del INF ya que se asocia de manera directa o indirecta a STAT-2 y está asociación conlleva a la degradación de STAT-2 vía proteasomas (Duan et al. 2008) .

Con todos lo antes descrito, es evidente que proteínas virales como NS1 y NS5 juegan un papel central en la infección con DENV; sin embargo, la manera en la que estas proteínas participan en el ciclo replicativo viral aún no se entiende completamente. Por ello, una manera de dilucidar algunas de las funciones de ambas proteínas es conocer con que proteínas celulares y virales interactúan y en que compartimento celular se localizan a los distintos tiempos de infección. Las proteínas o componentes celulares con los que interactúen NS5 y NS1 seguramente serán elementos de susceptibilidad o resistencia a la infección por DENV. Finalmente, reportes recientes sugieren que la proteína NS5 se ancla a la membrana plasmática, lo cual es un evento desconocido hasta ahora pues solo era clara su presencia en el citoplasma y en el núcleo de las células infectadas a partir de las 12 horas p.i.

II. JUSTIFICACIÓN

DENV es el agente causal de la enfermedad transmitida por mosquitos más importante en el mundo. Hasta el momento, no existe vacuna ni tratamiento anti-viral específico, por lo tanto el conocer las proteínas y componentes celulares que se requieren para la replicación viral, permitirá la comprensión de uno de los pasos más importantes en el ciclo replicativo viral.

Debido a que las proteínas virales NS1 y NS5 son componentes importantes del complejo replicativo viral, el identificar y caracterizar proteínas celulares que se unen a ellas, nos permitirá conocer factores de susceptibilidad o resistencia a la infección por DENV. Esta información nos ~~permitirá~~ ayudará a entender procesos más complejos como patogénesis, virulencia y tropismo viral.

III. HIPÓTESIS

Las proteínas NS1 y NS5 de DENV interaccionan con factores celulares importantes para el ciclo replicativo viral.

IV. OBJETIVO GENERAL

Identificar proteínas celulares que interaccionan con las proteínas virales NS1 y NS5 del virus del dengue y determinar la función que desempeñan en el ciclo replicativo viral en células Huh7.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar e identificar proteínas celulares que interaccionan con NS1 y NS5.
- Analizar la expresión y localización de algunas de las proteínas identificadas en la infección por DENV.
- Evaluar el comportamiento viral al silenciar algunas de las proteínas celulares identificadas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Propagación del virus y cultivos celulares

El virus dengue serotipos 4 y 2 (DENV 4 y DENV 2) cepas H241 y 16681 respectivamente fueron propagados en ratones CD-1 lactantes, los cuales se infectaron por vía intracraneal por un periodo de 4 a 5 días post-infección, el cerebro del ratón fue homogeneizado y clarificado por centrifugación y filtrado en una membrana de 0.22µM. El virus presente en el lisado celular fue titulado por ensayo de plaqueo en células BHK-21.

Adicionalmente DENV 2 fue propagado en células C6/36 HT₁ las cuales se cultivaron en frascos de 75 cm² a una confluencia del 70% (60 millones de células) en presencia de medio MEM (minimun essential medium), suplementado con 7% de suero fetal bovino, vitaminas, penicilina (50,000 U/ml) y estreptomicina (50mg/ml) a una temperatura de 34°C en ausencia de CO₂. La infección se permitió por 7 días o hasta observar un efecto citopático marcado. Las células infectadas fueron lisadas por el método de congelación-descongelación, el sobrenadante se clarificó por centrifugación (6000 rpm por 20 min) y fue filtrado en membrana de 0.22µM. El virus presente fue titulado por ensayo de plaqueo.

La línea celular Huh-7 (células de hepatocarcinoma humano) fue ~~for~~ crecidas en medio Advanced MEMD (Gibco) adicionado con glutamina (200 mM), suero fetal bovino al 7% (certificado marca Gibco), penicilina (50,000 U/ml), estreptomicina (5mg/ml) y fungisona (2.5 µg/mL) a 37°C en atmosfera de CO₂ al 5%.

6.1.1 Ensayo de plaqueo-titulación por placa lítica en células BHK-21 (Baby Hámster Kidney)

Para cuantificar la cantidad de unidades formadoras de placa que hay por mililitro de extracto de cerebro o de sobrenadante de células C6/36HT se usó ensayos de placas líticas en células de riñón de hámster (BHK-21). Las células BHK-21 fueron despegadas con solución de tripsina-EDTA al 0.1% y fueron sembradas en placas de 24 pozos al 10% de densidad con medio MEM (esencial mínimo) adicionando con bicarbonato de sodio, penicilina (50,000 U/ml) / estreptomicina (50 U/ml) y

suero fetal bovino al 7%. Las células se dejaron crecer a 37°C en presencia de 5% de CO₂. Cuando las células alcanzaron confluencia del 80 - 90% fueron infectadas con los extractos de cerebro o sobrenadante de células C6/36HT en diluciones seriadas en base diez en medio Hanks suplementado con 1% de SFB y antibióticos. Retirando el medio de los pozos, se añadió 200 µl de cada una de las diluciones y la infección de las células se permitió por 1 hora a 37°C y CO₂ al 5%. Al término de este periodo de incubación, se añadió 1 ml de medio MEM 2X con carboximetilcelulosa al 0.8%, suplementado con suero fetal bovino al 7% (SFB) y antibióticos (ampicilina y estreptomycin). Las células se incubaron por 5 días a 37°C y CO₂ al 5%. Trascurrido el tiempo, las células fueron teñidas con un colorante vital naftol blue - black (20% de acetona, 3% de ácido tricloroacético, 1% de naftol blue - black) por 15 min a temperatura ambiente en agitación suave. El colorante se lavó con agua corriente y se contaron las placas líticas. El título viral se obtuvo multiplicando el promedio de las placas contadas por el factor de dilución a la cual se realizó el conteo expresado en unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/ml).

6.2 Preparación de extractos proteicos citoplasmáticos enriquecidos con membranas

Se usaron 20 placas p100 de células Huh-7 a una confluencia del 70% (7 millones de células aproximadamente) las células fueron infectadas con DENV 2 a una multiplicidad de infección de 3 (MOI 3) ~~la infección se permitió~~ por 2 hrs a 37 °C con atmosfera de CO₂ al 5%, luego se cosecharon a las 24 hpi, se prepararon los extractos; para ello, primero se lavaron las células con 2 ml de PBS 1X frío, una vez retirado el PBS de lavado, se agregó 1 ml por placa del buffer de despegado (Tris HCl 40 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM). Las células se recolectaron con el gendarme y fueron centrifugadas a 3000 rpm por 5 min a 4°C. La pastilla se lavó 2 veces con 1 ml la solución amortiguadora A (HEPES 10 mM a pH 7.9, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 10 mM). Se retiró el sobrenadante para re-suspender la pastilla en 1 volumen (aproximado de 100 o 200 µl) de la solución A más 20 µl de cocktail inhibidor de proteasas libre de EDTA, DTT o EGTA (Roche).

~~Las células fueron~~ homogenizadas a 4°C, el lisado celular fue centrifugado a 10000 rpm a 4° C por 30 min ~~y el sobrenadante correspondió~~ a la fracción del citoplasma ~~mientras que,~~ la pastilla obtenida se lavó 3 veces adicionando 500 µl de Buffer D (20 mM TRIS, pH 7.8, 5 mM MgCl₂, 320 mM KCl, 0.2mM EGTA, 0.5 mM DTT y 2mM ZnCl₂) y se centrifugó a 2500 rpm a 4° C por 3 min. La pastilla fue lavada y re-suspendida con 300 µl de Buffer D e incubado 20 min en hielo. Pasado este tiempo, se re-suspendió ~~esta la~~ fracción rica en proteínas de membrana, ~~la cual al igual que con~~ la fracción ~~citoplasmática,~~ ~~se sometió a~~ ~~cuantificación de proteínas~~ ~~fue cuantificada~~ por el método de BCA (thermo scientific) y se guardó a -70°C hasta su uso.

6.2.1 Preparación de extractos proteicos nucleares

Para la preparación de extractos nucleares se usaron 20 placas p100 de células Huh-7 a una confluencia del 70% (7 millones de células), las células fueron infectadas con DENV 4 a una MOI 3, ~~la infección se permitió~~ por 24 horas. ~~P,~~ pasado el tiempo post-infección, las células se lavaron con 2 ml de PBS 1X. A continuación, se retiró todo el PBS de lavado y se agregó 1 ml por placa de buffer de despegado (Tris HCl 40 mM pH 7.5, EDTA 1mM, NaCl 150 mM) ~~se recolectaron,~~ las células ~~se colectaron~~ con un gendarme. Las células se centrifugaron a 3000 rpm por 5 min a 4°C. Después, la pastilla se lavó dos veces con 1 ml de solución amortiguadora A (HEPES 10 mM a pH 7.9, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 10 mM). Se retiró el sobrenadante y la pastilla fue re-suspendida en 1 volumen (aproximado de 100 o 200 µl) de la solución A más 20 µl de cocktail inhibidor de proteasas libre de EDTA, DTT o EGTA. Las células se lisaron a 4°C con ayuda de un homogeneizador. La mezcla se centrifugó a 10000 ~~rpm~~ a 4°C por 30 min y ~~la proteína presente en~~ el sobrenadante correspondiente a la fracción del citoplasma se cuantificó ~~la cantidad de proteína~~ por el método de BCA y se guardó a -70°C hasta su uso. La pastilla obtenida anteriormente se lavó 1 vez con 500 µl de buffer C (10 mM de TRIS pH 7.8, 5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.3 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 0.3 M sucrosa, 10 mM B-glicerol fosfato y 2 mM de ZnCl₂) se

centrifugó a 2500 rpm por 3 min a 4°C. La pastilla recuperada se re-suspendió en 300 µl de buffer D (20 mM TRIS, pH 7.8, 5 mM MgCl₂, 320 mM KCl, 0.2mM EGTA, 0.5 mM DTT y 2mM ZnCl₂) más 10 µl de cocktail inhibidor de proteasas libre de EDTA, DTT o EGTA. La mezcla se incubó 15 min en hielo y posteriormente se sonicó por 10 seg al 100%. La mezcla fue centrifugada por 15 min a 13000 rpm a 4°C y la proteína presente en el sobrenadante, correspondiente a la fracción nuclear, esta fracción fue cuantificada por el método de BCA y se guardó a -70°C hasta su uso.

6.3 Preparación de bacterias *E. coli* DH5α competentes

Bacterias *E. coli* (DH5-α) fueron crecidas en medio líquido (Luria Broth) a una temperatura de 37°C en agitación constante toda la noche. El inóculo fue diluido al 1% en medio fresco, las bacterias se dejaron crecer a 37°C en agitación constante hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.6 (fase logarítmica tardía). Las bacterias fueron centrifugadas a 4000 rpm a 4°C durante 15 min, el sobrenadante se retiró por decantación y la pastilla se re-suspendió con 8 ml de FSB (Frozen Storage Buffer, KCl 100 mM, CaCl₂-2H₂O 50 mM, CH₃CO₂K 1M pH 7.5 y glicerol 10%), se incubando la mezcla por 15 min a 4°C. A continuación, las bacterias fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 15 min a 4°C, posteriormente se añadieron 70 µl de DMSO (dimetilsulfóxido). Después se añadieron de nuevo 70 µl de DMSO, se re-suspendieron e incubaron 15 min a 4°C. Finalmente, se congelaron con nitrógeno líquido en alícuotas de 50 µL por tubo estas y se guardaron a -70°C hasta su uso.

6.3.1 Transformación de bacterias *E. coli* DH5α y BL-21* competentes por choque térmico

Se tomaron 50 µl de bacterias competentes y se descongelaron en hielo, a continuación se adicionó 1 µl de la construcción y se incubó por 15 min en hielo, pasando rápidamente al termoblock para ser incubado a 42°C por 30 seg. Después se incubó de nuevo en hielo por 3 min. Se le adicionaron 600 µl de medio

LB permitiendo la recuperación de las bacterias por 1 hora a 37 °C con agitación suave. La suspensión bacteriana se espatuló en una placa de Agar-LB con ampicilina (100 mg/ml) y se incubó a 37°C toda la noche. Una colonia fue seleccionada y se cultivó en medio LB líquido con ampicilina (100 mg/ml) ; se tomó una alícuota de este cultivo para realizar una dilución en 1:10 con medio LB fresco con ampicilina (100mg/ml) ; L las bacterias fueron crecidas toda la noche a 37°C en agitación constante. A continuación, ~~pasado el tiempo~~ las bacterias fueron centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos ; el sobrenadante fue retirado por decantación ; la pastilla fue congelada a -20°C para purificar plásmido por lisis alcalina.

6.3.2 purificación del plásmido pProExb-NS1 por lisis alcalina

La pastilla anterior fue re-suspendida en buffer GTE (50mM de glucosa, 25 mM de TRIS pH 8.0, 10 mM de EDTA) fue incubada a temperatura ambiente por 5 min, después se le adicionaron 200 µl de solución NaOH/SDS (0.2 N de NaOH, 1% SDS) la suspensión fue mezclada gentilmente y después se incubó en hielo por 5 min. Pasado el tiempo se le adiciono 150 µl de acetato de potasio 5M pH 4.8 se agitó rápidamente por 2 segundos y después se incubó en hielo por 5 min, se eliminó el DNA cromosomal y basura celular mediante centrifugación spin por 3 min, el sobrenadante fue transferido a otro tubo para ser mezclado con etanol al 95% para precipitar los ácidos nucleicos por 2 minutos a temperatura ambiente, se le realizó un spin de 1 min a temperatura ambiente (el pellet es el DNA plasmidico) este fue re-suspendido con 1 ml de etanol al 70% . Finalmente, el pellet fue re-suspendido en buffer TE (TRIS/EDTA) la pastilla fue guardada a -20°C hasta su utilización.

6.4 Expresión de la proteína NS1 recombinante

Para tener una cantidad suficiente de proteína NS1 recombinante y realizar los ensayos de cromatografía de afinidad, bacterias BL-21* transformadas por choque térmico con el plásmido recombinante p-ProEx-NS1 fueron crecidas en una placa agar-LB con 100 mg/ml de ampicilina toda la noche a 37°C. P pasado

el tiempo, una colonia fue seleccionada y se creció en 10 ml de medio LB líquido a 37°C toda la noche en agitación constante. ~~A continuación, pasado este periodo de incubación~~ se tomaron los 10 ml del cultivo y se diluyeron en 1 litro de medio LB fresco (medio Luria Broth, 1 ml de ampicilina y 30 ml de glucosa 1M) ~~y se incubaron~~ a 37°C con agitación constante hasta que el crecimiento alcance una OD₆₀₀ (densidad óptica) de 0.60 - 0.8. El medio fue retirado por centrifugación a 3000 rpm por 20 min a 4°C, la pastilla fue re-suspendida en 1 litro de medio LB y 100 mg/ml de ampicilina, a continuación se realizó la inducción de la proteína NS1 con 500 µl de IPTG 1M (Isopropil-β tio-galactósido), por 20 horas a 37°C. Finalizada la inducción, las bacterias fueron centrifugadas a 8500 rpm a 4°C por 25 min ~~y~~ la pastilla fue congelada a -20°C hasta su uso. ~~Después,~~ la pastilla fue descongelada a temperatura ambiente, se le adicionaron 5 ml de buffer de lisis bacteriana (50mM de TRIS pH 8.0, 300 Mm de NaCl, glicerol al 10% y Triton X-100 al 0.1 %) acompañado de una pizca de lisosima y 500 µl del cocktail inhibidor de proteasas libre de EGTA, DTT, EDTA. La mezcla se dejó en reposo 60 min en hielo para después ~~soñenar~~ ~~la por~~ 10 segundos en On / 10 segundos en Off por 3 min. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 6000 rpm a 4°C por 45 min. El sobrenadante se separó para adicionarle 500 µl del cocktail inhibidor de proteasas y la pastilla se guardó a -20°C.

La presencia de la proteína fue verificada mediante ensayos de Western blot utilizando dos anticuerpos: ~~anti-~~NS1 y ~~anti-~~His.

6.4.1 Expresión de la proteína NS5 recombinante

La clonación y expresión en bacteria de la proteína viral NS5 de DENV-4 se mandó ~~a~~ hacer a los laboratorios GenScript en New Jersey, USA. La proteína que nos enviaron se obtuvo a partir de 1 litro de medio de cultivo LB, la cual fue purificada por afinidad a partir de cuerpos de inclusión. Tiene una concentración final de 0.378 mg/ml y una pureza del 80%. Esta proteína se conserva a -70°C en un buffer a pH 8.0 el cual contiene 20 mM de PB, glicerol al 5% y 150 mM de NaCl.

6.4.2 Purificación y acoplamiento de la proteína NS1 recombinante a una columna de afinidad

El sobrenadante bacteriano obtenido de bacterias inducidas se puso a interactuar con 500 µl de la resina TALON (resina de afinidad a metal, TALON clontech) previamente lavada con agua destilada estéril y equilibrada con buffer de lisis bacteriana, la interacción se permitió toda la noche a 4°C con agitación suave. La resina se recuperó por centrifugación a 1500 rpm durante 5 min a 4°C, la resina se lavó 5 veces con buffer A (50 mM de TRIS, 500mM de NaCl, Triton X-100 al 0.1%, Glicerol al 10% y etanol al 10%) y 7 veces con buffer A e imidazol a las siguientes concentraciones: 5 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 250 mM, 300 mM y 350 mM. Una vez que fueron eliminadas todas las interacciones inespecíficas, la resina se corrió en un gel SDS-PAGE al 7.5% ~~el cual el gel~~ fue teñido con azul brillante de Coomassie (R250, Bio-Rad). ~~La~~ la presencia de la proteína fue evaluada mediante ensayos de Western blot utilizando anticuerpos específicos contra esta. Como control negativo utilizamos el mismo volumen de resina incubada con extracto de bacterias transformadas con el plásmido (pProEx sin el inserto que codifica para la proteína NS1). ~~Esta~~ Esta resina fue sometida al mismo tratamiento anteriormente descrito.

6.4.3 Acoplamiento de la proteína NS5 recombinante a la resina NiNTA

La proteína recombinante no estructural NS5, con una concentración de 0.378 mg/ml, se puso a interactuar con la resina NiNTA (Níquel-Nitriltriacetato agarosa al 50%). La resina fue previamente centrifugada a 2000 rpm a 4°C por 2 min para retirar el sobrenadante después se lavó 3 veces con 5 ml de agua destilada estéril. A continuación fue nuevamente recuperada por centrifugación a 3000 rpm a 4°C por 3 min, se equilibró 3 veces con 5 ml de buffer para purificar proteínas de manera nativa 1X (50 mM de NaH₂PO₄ pH 8.0 y 0.5 M NaCl) se puso a interactuar con 600 µl de la proteína NS5 recombinante, se dejó toda la noche a 4°C con agitación suave. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante y la resina a 3000 rpm a 4°C por 3 min.

6.5 Interacción de la proteína recombinante NS1 con el extracto citoplasmático enriquecido con proteínas de membrana

Con el objetivo de eliminar interacciones inespecíficas de las proteínas celulares con la resina se tomaron 500 µl de la resina TALON (sin proteína recombinante interaccionando), la resina fue lavada previamente 5 veces con agua destilada estéril y equilibrada con buffer de lisis, después fue incubada con 2mg/ml de extractos citoplasmáticos enriquecidos con proteínas de membrana en buffer de interacción (TRIS-base 20 mM, NaCl 200 mM e imidazol 20 mM). La interacción se permitió toda la noche a 4°C con agitación suave. La resina y el extracto fueron recuperados por centrifugación a 3000 rpm por 3 min a 4°C. En un tubo Falcon de 15 ml se puso a interaccionar el extracto celular previamente recuperado con 500 µl de la resina acoplada a la proteína NS1 recombinante, se le adicionó 5 volúmenes de buffer de interacción (Tris base 20mM, NaCl 200 mM e imidazol 20 mM) ~~esta se permitió y se dejó~~ toda la noche a 4°C con agitación suave. La resina fue recuperada por centrifugación y se sometió a 8 lavados con 5 volúmenes de buffer de lavado el cual contiene concentraciones crecientes de imidazol y NaCl disueltos en buffer A por 10 min (6 mM de imidazol y 250 mM de NaCl, 7.5 mM de imidazol y 250 mM de NaCl, 7.5 mM de imidazol y 300 mM de NaCl, 7.5 mM de imidazol y 350 mM de NaCl, 7.5 mM de imidazol y 400 mM de NaCl, 10 mM de imidazol y 450 mM de NaCl) después se realizaron dos eluciones con NaCl (0.5 M y 1 M). Este procedimiento se realizó a ~~la~~ par para el control negativo (resina interaccionada con el sobrenadante de bacterias que no expresan NS1). El contenido de cada lavado fue recuperado para precipitar el contenido proteico con acetona.

6.5 Interacción de la proteína recombinante NS5 con el extracto nuclear

Se tomaron 500 µl de la resina NiNTA (sin proteína recombinante interaccionando) previamente lavada 3 veces con agua destilada estéril y equilibrada con buffer para purificar proteínas de manera nativa 1X (50 mM de NaH₂PO₄ pH 8.0 y 0.5 M NaCl). 2 mg/ml de extractos nucleares se dejaron interaccionando con el buffer de unión (50 mM de NaH₂PO₄ pH 8.0, 0.5 M NaCl y 10 mM de imidazol) toda la

noche a 4°C con agitación suave. Esto evitó unión inespecífica de proteínas con la resina. La resina y el extracto fueron recuperados por centrifugación a 3000 rpm por 3 min a 4°C. En un tubo Falcon de 15 ml se pusieron 500 µl de la resina acoplada a la proteína NS5 recombinante, 2 mg/ml de extractos pre-aclarados se pusieron a interactuar con 5 volúmenes de buffer de interacción (50 mM de NaH₂PO₄ pH 8.0, 0.5 M NaCl y 10 mM de imidazol). La interacción fue permitida toda la noche a 4°C con agitación suave. La resina fue recuperada por centrifugación a 3000 rpm por 5 min a 4°C, la resina fue sometida a 8 lavados con 5 volúmenes de buffer de lavado el cual contiene concentraciones crecientes de imidazol y NaCl disuelto en buffer para purificar proteínas de manera nativa 1X por 10 min (6 mM de imidazol y 250 mM de NaCl, 7.5 mM de imidazol y 250 mM de NaCl, 7.5 mM de imidazol y 300 mM de NaCl, 7.5 mM de imidazol y 350 mM de NaCl, 7.5 mM de imidazol y 400 mM de NaCl, 10 mM de imidazol y 450 mM de NaCl). A continuación, después se realizaron dos eluciones con NaCl (0.5 M y 1 M). El contenido de cada lavado se recuperó para precipitar las proteínas con acetona.

6.5.1 Precipitación de proteínas con acetona

Los lavados de las interacciones de las resinas acopladas a NS1 y NS5 con extractos citoplasmáticos y nucleares respectivamente fueron recuperados para precipitar el contenido proteico. A cada condición se le adicionaron al menos 3 volúmenes de acetona fría y se dejaron incubando toda la noche a -20°C, la fracción proteica fue recuperada por centrifugación a 6000 rpm por 20 min a 4°C mientras que el sobrenadante fue eliminado por decantación. Los tubos fueron destapados para facilitar la evaporación de la acetona y poder trabajar con la pastilla, la cual fue re-suspendida en 40 µl de amortiguador isotónico para ser resuelto por SDS-PAGE al 7.5%. El gel fue teñido con azul de Coomassie (Bio-safe, BioRad). Las bandas visualizadas fueron cortadas, digeridas del gel con tripsina, y los péptidos resultantes fueron analizados por espectrometría de masas por MALDI-ToF en el Protein Core Lab Facility en la Universidad de Columbia en New York, NY.

6.6 Inmunoprecipitación

Se tomaron 100 µl de proteína G-agarosa la cual se lavó 3 veces con PBS 1X por 3 minutos y se recuperó por centrifugación. Después, la proteína G-agarosa fue bloqueada por la adición de 200 µl de BSA a una concentración de 2 mg/ml y se dejó 2 horas a 4°C en agitación constante. Una vez terminado el tiempo de bloqueo, se le adicionó el anticuerpo contra la proteína de interés (α -NS1 hecho en conejo) en una dilución 1:20 permitiendo la interacción toda la noche a 4°C con agitación suave. La proteína G-agarosa unida al anticuerpo se recuperó por centrifugación 2000 rpm a 4°C por 5 min. Una vez recuperado el pellet, el cual contiene a la proteína-G agarosa unida al anticuerpo de interés, se realizó el entre cruzamiento utilizando 50 mM de DSG (disuccinimidyl glutarate, invitrogen) en PBS 1X permitiendo la interacción por 30 min a temperatura ambiente en agitación constante.

Las perlas fueron lavadas con 200 µl de PBS 1X-triton X-100 al 0.5% por 5 min en agitación constante. Se realizó el quench con 200 µl de buffer de quench (50mM de TRIS pH 7.4) por 15 min a temperatura ambiente y el exceso de anticuerpo fue removido con un lavado con 500 mM de NaCl por 5 min a temperatura ambiente. El exceso de sal se eliminó lavando con PBS 1X pH 7.4 por 5 min. Después, las perlas fueron equilibradas con buffer de lisis. A la par, se tomaron 50 µl de proteína G agarosa, la cual esta proteína fue lavada 3 veces con agua destilada estéril y equilibrada con buffer de lisis. La proteína-G (sin anticuerpo acoplado) se puso a interaccionar con 2 mg/ml de extractos citoplasmáticos la interacción se permitió por 3 horas a 4°C. Pasado el tiempo de incubación, el extracto fue recuperado por centrifugación a 2000 rpm a 4°C por 5 min. Esta interacción eliminará la unión inespecífica de la proteína-G agarosa con las proteínas celulares. El extracto recuperado se puso a interaccionar con 100 µl de proteína-G agarosa acoplado al anticuerpo anti-NS1 y la interacción se permitió toda la noche a 4°C con agitación suave. Las perlas (proteína-G agarosa) fueron recuperada por centrifugación y se procedió a lavar 5 veces con

200 μ l de solución IP por 10 min en agitación constante (Tris pH 8.0 0.05 M, NP40 1%, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM) a temperatura ambiente.

Por último, los inmunocomplejos fueron eluidos con 500 mM de NaCl. Todos los sobrenadantes fueron colectados y el contenido proteico fue recuperado mediante precipitación con acetona como ya se ha descrito previamente. ~~A~~ Las proteínas recuperadas se les adicionaron 30 μ l de buffer de carga y fueron resueltas en un gel SDS-PAGE al 10%. El gel fue teñido con azul de Coomassie como previamente se ha descrito para identificar las proteínas que interaccionan con la proteína NS1 viral por espectrometría de masas (Maldi-TOF).

6.7 Análisis de los datos obtenidos por espectrometría de masas

Las proteínas identificadas con el score más elevado y representados con la mayor cantidad de péptidos, se utilizaron para análisis "*in silico*" utilizando el programa STRING data base 6.1 (<http://string-db.org/>) dando como resultado los mapas proteicos de las proteínas celulares que interaccionan con NS1 y NS5, adicionalmente se utilizó la base de datos uniprot y DAVID para realizar la clasificación de las proteínas de acuerdo a su función y localización sub-celular (<http://www.uniprot.org/>) (<https://david.ncifcrf.gov/>).

6.8 Cinética de infección en Células Huh-7 y Western blot

Células Huh-7 ~~fueron~~ crecidas en multiplacas de 6 pozos a una confluencia del 60% (1.0×10^6 células) ~~las células~~ fueron infectadas a MOI 3 por 6, 24 y 48 horas ~~con~~ mocksin virus (mock), ~~con~~ virus inactivo (VI) y ~~con~~ DENV-2. ~~P~~ pasado el tiempo post-infección, las células fueron lisadas con 70 μ l de buffer de lisis. ~~E~~ el extracto total fue cuantificado por el método de BCA. Se tomaron 35 μ g/ml de extracto total ~~y~~ las proteínas fueron resueltas en un gel SDS-PAGE al 10% ~~y~~ transferidas a membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). ~~L~~ la membrana fue bloqueada con leche al 10% libre de grasa y se incubó con los siguientes anticuerpos: α -NS3 (1:5000, GeneTex), α -RPL18 (1:5000, ab-Cam), α -GAPDH (1:10000, Cell signaling), α -RPL18a (1:3000, GeneTex) y α -actina (1:1000, generosamente donado por el DR. Manuel [Hernández](#)) permitiendo la interacción

con la membrana toda la noche a 4°C. Los anticuerpos secundarios fueron ~~α-anti~~-ratón, ~~α-anti~~-conejo y ~~α-anti~~-chivo (1:10000, 1:000, 1:30000, ~~respectivamente~~ cell signaling) ~~que respectivamente~~ se incubaron ~~con la membrana~~ ~~en~~ por una hora a temperatura ambiente. ~~L~~ la membrana fue revelada por quimioluminiscencia utilizando el kit Femto (thermo-Scientific) y placas Kodak.

6.9 Inmunofluorescencias

Para los ensayos de inmunofluorescencia, se sembraron 200,000 células Huh-7 sobre laminillas en una placa de 24 pozos. Las células fueron infectadas a una confluencia del 70 – 80% con DENV 2 a una MOI de 3 por 2 hora a 37°C en presencia de CO₂ al 5%. Pasado el tiempo de infección se retiró el inoculo de las células y se le adicionaron 500 µl de medio completo para células Huh-7 (anteriormente descrito en cultivo celular) la infección fue permitida por 48 horas. Pasado el tiempo post-infección las células fueron lavadas 3 veces por 5 minutos con PBS 1X y se les adicionó 200 µl de formaldehido al 1% por 20 min a temperatura ambiente para ser fijadas. El formaldehido fue retirado y las células se lavaron 3 veces con PSB 1X. Las células fueron permeabilizadas por 20 min con solución permeabilizadora (saponina 0.2%, SFB 1% en PBS 1X), las proteínas virales fueron ~~marcadas detectadas~~ con los siguientes anticuerpos primarios: ~~α-α~~-NS1 (1:200, GeneTex) o ~~α-α~~-E (1:200) o NS5 (1:200, GeneTex) y contra las proteínas celulares ~~α~~-GAPDH (1:200, cell signaling) o ~~α~~-RPL 18 (1:100, Ab-Cam) o ~~α~~-DDX5 (1:100, Ab-Cam) o ~~α~~-NHRP F (1:100, Ab-Cam). ~~L~~ la incubación ~~con los anticuerpos~~ se permitió toda la noche a 4°C ~~y~~ después las células fueron incubadas con 2 µg/ml de Alexa-488 burro ~~α-anti~~-ratón IgG, Alexa-555 chivo ~~α-anti~~-conejo IgG o con Alexa 647 pollo ~~α-anti~~-chivo IgG por 1 hora a temperatura ambiente. ~~L~~ los núcleos fueron teñidos con Hoechst (Santa Cruz) ~~y~~ las laminillas fueron observadas en el microscopio confocal Zeiss LSM700.

6.10 Silenciamiento del gen de interés empleando siRNA

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Para disminuir la expresión de la proteína RPL18 en células Huh-7 y Vero R4, las células fueron transfectadas con dos diferentes concentraciones del siRNA (100 y 150 nM) específico contra la proteína ribosomal 18 (Santa Cruz) además se utilizó un siRNA no relacionado como control. Las células Huh-7 fueron crecidas en medio advance DMEM suplementado con 10% de SFB y sin antibioticos a 37°C con atmosfera de CO₂ al 5% a una confluencia del 70%. Dos tubos fueron preparados: a) 100 o con 150 nM del siRNA especifico diluido en 100_μl de medio de transfección (Opti-MEM, Life Technologies) y b) 1.5 μl de siPORT (Applied Biosystems) en 100 μl de medio de transfección. La mezcla fue incubada por 10 min a 37°C, pasado el tiempo las dos mezclas fueron unidas con la pipeta e incubadas por 10 min más, después 200 μl de medio de transfección con el siRNA fueron adicionados a las células. Las células fueron incubadas por 8 horas a 37°C en presencia de CO₂. Después se le adicionaron 200_μl de medio fresco el cual contiene 15% de SFB. 24 horas pos-transfección, las células fueron re-transfectadas bajo las mismas condiciones y 24 horas después de la segunda transfección, las células fueron infectadas con DENV-2 a una MOI de 3 por 24 o 48 horas. El rendimiento viral y la secreción de NS1 fueron determinados en el sobrenadante de las células infectadas por ensayos de plaqueo (descrito anteriormente) y ensayos de ELISA (Platelia, Bio-Rad).

6.11 Viabilidad y metabolismo celular después del silenciamiento

La viabilidad de las células Huh-7 y Vero fue evaluada por la medición de la reducción de MTS de acuerdo al protocolo de manufactura (cell titer 96 aqueous one solution cell proliferation assay, promega).

6.11.1 Marcaje con [³⁵S]-Metionina

Las células ~~H~~huh-7 ~~fueron~~ crecidas a una confluencia del 70% (6x10⁵ células). ~~Las células~~ fueron transfectadas con el siRNA dirigido contra la proteína RPL18 y como control ~~se con utilizó unun~~ siRNA no relaciondo. A continuación, las células fueron lavadas 2 veces con 10 ml de medio de pulso (medio ausente de metionina y cisteína), después las células fueron incubadas con 500 μl con medio de pulso

por 25 min a 37°C en atmosfera de CO₂ con el objetivo de ponerlas en ayuno y así depletar la metionina/cisteína que hay de manera intracelular. Pasado el tiempo de ayuno, se le adicionó 500 µl de medio que contiene 7 µCi/ml metionina marcada [³⁵S]-Meth (PerkinElmer) por 30 min a 37°C. Finalmente, el medio fue removido y las células se lavaron 2 veces con PBS 1X frio. Las células fueron lisadas y el total de proteínas fueron analizadas mediante un gel SDS-PAGE al 8% y visualizadas mediante auto-radiografía.

6.11.2 Tinción con nitrato de plata y azul de Coomassie (Bio-Safe)

El extracto total de células Huh-7 transfectadas fueron analizadas en un gel SDS-PAGE al 10% y el patrón electroforético fue visualizado al teñir el gel con nitrato de plata y azul de Coomassie (Bio-Safe). Para hacer la tinción con nitrato de plata primero se fijó el gel con solución de fijado (metanol al 50% y ac. Acético al 5%) por 20 min a temperatura ambiente. Después el gel fue lavado 2 veces con agua milliQ por 1 minuto, el gel fue sensibilizado con tiosulfato de sodio al 0.01% por 1 min, y se lavó 2 veces con agua milliQ por 1 min. Inmediatamente, el gel fue teñido con nitrato de plata al 0.1% la tinción se permitió por 30 min a 4°C en agitación suave protegiendo de la luz. Pasado el tiempo, se lavó 2 veces con agua milliQ y las bandas fueron visualizadas al revelarlas con carbonato de sodio y formalina. Por último, se fijó con ac. Acético al 5%. Para la tinción con azul de Coomassie bio-safe, el gel se fijó con metanol al 50% por 30 min, pasado el tiempo, el gel se lavó con agua milliQ dos veces por 5 minutos, se le adicionaron 20 ml de azul de Coomassie bio-safe y la tinción se permitió por 45 min a temperatura ambiente en agitación suave. Finalmente, el gel fue desteñido con agua corriente.

6.12 qRT-PCR y actividad de luciferasa

La actividad de luciferasa fue medida en células Vero que expresan de manera estable el replicón de dengue virus 4 (R4). Las células fueron transfectadas con el siRNA específico o con el control y la actividad de luciferasa fue medida como

lo indica el protocolo del kit (Renilla luciferase assay systems, Promega). Para determinar los niveles del genoma viral, el RNA total fue obtenido usando el kit zymo Research Quick-RNA (microPrep) y la qRT-PCR fue realizada por el método SYBR green usando primers dirigidos contra la proteína NS5 de acuerdo a lo reportado por Chien LJ (2006) en el ECO ILLUMINA. La cantidad de RNA viral fue calculado al generar una curva estándar en diluciones base 10 de aislado de RNA de DENV-4 y DENV-2.

VII. RESULTADOS

7.1 Aislar e identificar proteínas celulares que interaccionen con las proteínas virales NS5 y NS1

7.1.1 Proteínas celulares que interaccionan con la proteína no estructural 5 (NS5) de DENV en células Huh-7

La proteína no estructural NS5 de DENV4 fue sintetizada en el laboratorio GenScript en New Jersey, USA y purificada a partir de cuerpos de inclusión. La preparación proteica tiene una concentración de 0.378 mg/ml y una pureza del 80%. Para evaluar la pureza de esta proteína se usó para fijar a la proteína a la columna de níquel. La resina con la proteína acoplada se sometió a electroforesis en un gel SDS-PAGE al 8% y fue teñido con azul de Coomassie (R250, Bio-Rad) (Figura 3, panel A). La presencia de una proteína de aproximadamente 130 kDa se observó después de la tinción con azul de Coomassie. La presencia de NS5 con la cola de histidinas fue verificada al realizar ensayos de Western blot con un anticuerpo policlonal específico contra la cola de histidinas (anti-His) (Figura 3, panel B). Para aislar proteínas celulares que interaccionan con la proteína no estructural 5 (NS5) se utilizó cromatografía de afinidad usando la proteína recombinante. Esta proteína fue acoplada a una columna de afinidad (NiNTa, Qiagen) la columna fue puesta a interaccionar con los extractos nucleares de células HuH-7 no infectadas. Como control negativo, se incubó la resina sin la proteína recombinante con los extractos nucleares no infectados de células

HuH-7. Después de 6 lavados con diferentes concentraciones de NaCl (líneas 1-6, Figura 4) se realizaron 2 eluciones con 1M y 1.5 M de NaCl. La mayoría de las proteínas que interaccionan con la proteína NS5r fueron obtenidas en la fracción que corresponde a 1M de NaCl, estas proteínas están ausentes en la misma fracción en la resina control (Figura 4B). Por medio de espectrometría de masas (Maldi Tof) se realizó la identificación de 40, 42 y 36 proteínas en 3 experimentos independientes, hechos por duplicado. Estas proteínas fueron capaces de interaccionar directa o indirectamente con la proteína NS5r. La mayoría de las proteínas identificadas están ausentes en la resina que se utilizó como control negativo. Un total de 36 proteínas celulares fueron identificadas que interaccionan con la proteína viral NS5 (Tabla 1).

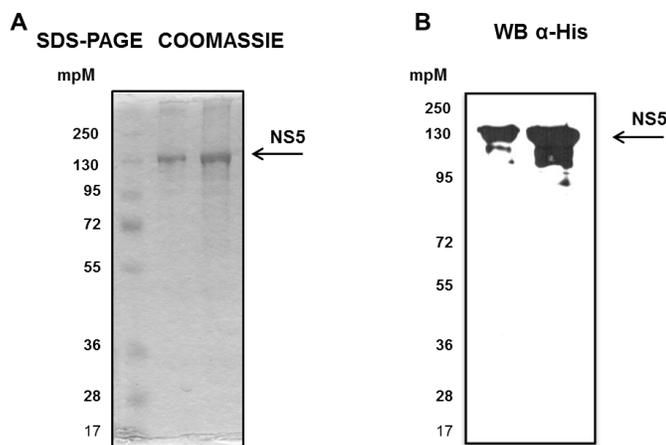


Figura 3. Proteína NS5 recombinante acoplada a la cromatografía de afinidad. 500µl de la resina (NinTa, QiaGen) se pusieron a interaccionar con 500 µl de la proteína recombinante para que se acoplara a la resina por medio de la cola de 6-His. (A) Dos diferentes cantidades de resina acoplada a la proteína NS5 se separó por SDS-PAGE al 10% y se tiñó con azul de Coomassie. (B) Western blot utilizando anticuerpo anti-His.

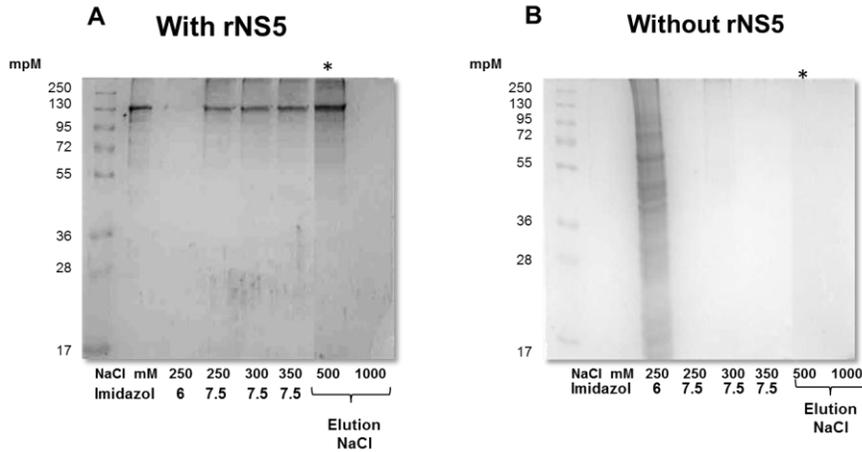


Figura 4. Obtención de proteínas celulares que interaccionan con la proteína NS5r por cromatografía de afinidad. Resina (NinTa, QiaGen) acoplada a la proteína NS5r (A) o con la resina empleada como control negativo (B) * representa la fracción de proteínas que interaccionan con la proteína NS5r. Las proteínas presentes en esta fracción (1M de NaCl) fueron identificadas por espectrometría de masas Maldi-ToF.

Tabla 1. Proteínas aisladas e identificadas por espectrometría de masas (Maldi-ToF) que interaccionan con NS5

Proteína identificada	Mascot score	# Peptide sequences indentified	String Accesion #
Tubulin beta chain	299	7	TBB5
Tubulin beta-2A chain	191	6	TBB2A
Tubulin beta-4B chain	160	5	TBB4B
Tubulin alpha-1A chain	38	5	TBA1A
Vimentin	286	16	VIME
L-lactate dehydrogenase B chain	76	2	LDHB
Fructose-bisphosphate aldolase A	63	3	ALDOA
Endoplasmin	59	7	ENPL
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	59	2	DDX5
Heat shock protein HSP 90-beta	54	5	HS90B
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	53	1	G3P
Far upstream element-binding protein 2	52	1	FUBP2
Elongation factor 2	52	1	EF2
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein	49	2	IF2B2
60 kDa heat shock protein, mitochondrial	45	3	CH60
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	45	3	ATPA

cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	45	1	KAP0
Peroxiredoxin-1	43	4	PRDX1
Peroxiredoxin-6	28	1	PRDX6
40S ribosomal protein S25	49	1	RS25
60S ribosomal protein L18	41	1	RL18
60S ribosomal protein L19	40	1	RL19
40S ribosomal protein S14	56	1	RS14
60S ribosomal protein L27	29	1	RL27
Prelamin-A/C OS	39	4	LMNA
Cofilin-1	39	3	COF1
Pyruvate kinase isozymes M1/M2	38	3	KPYM
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	36	1	HNRPF
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	36	4	HNRPK
ATP-dependent RNA helicase DDX3X	33	1	DDX3X
Histone H2B type 1-C/E/F/G/I	31	2	H2B1C
Stress-70 protein, mitochondrial	31	1	GRP75
Aconitate hydratase, mitochondrial	30	1	ACON
Heat shock protein beta-1	28	1	HSPB1
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	27	1	SFPQ
14-3-3 protein zeta/delta	27	4	1433Z

7.1.2 Caracterización funcional de las proteínas celulares que interactúan con NS5

En un intento por clasificar y caracterizar las proteínas celulares identificadas, se categorizaron de acuerdo a su función (Tabla 2), la localización sub-celular fue determinada utilizando la base de datos <http://www.uniprot.org/uniprot/P07437> un total de 36 proteínas identificadas fueron categorizadas en 5 diferentes compartimentos celulares: 33% de las proteínas identificadas pertenecen al núcleo, 33% al citosol, 11% a la mitocondria, 6% son proteínas de membrana y 17% son ribosomales (Figura 5).

Tabla 2. Clasificación biológica de las proteínas celulares que interactúan con NS5

Biological Process	Proteins
--------------------	----------

Microtubule based process	5
Translation	6
spliceosome	5
Metabolic process	7
Stress response	4
Lipid metabolism	3
Other process	6

Tabla 2. Clasificación biológica de las proteínas celulares que interaccionan con Ns5. La categorización de las proteínas identificadas que interaccionan con NS5 se realizó con la base de datos DAVID Bio-informatics Resources (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) y REACTOME pathway database (<http://www.reactome.org>).

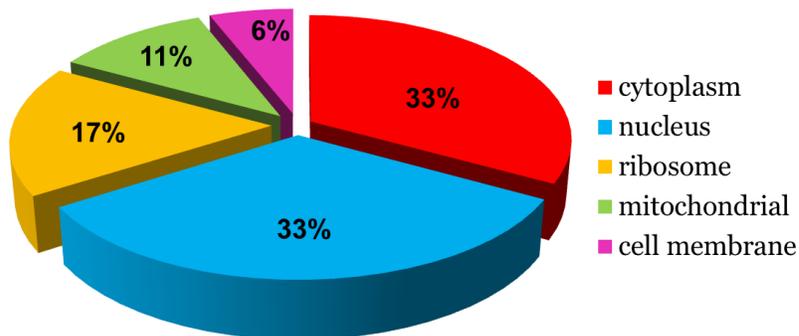


Figura 5. Localización sub-celular de las proteínas celulares que interaccionan con NS5 identificadas por espectrometría de masas. La localización sub-celular de las proteínas que interaccionan con NS5 fue analizada usando el programa bioinformático Swiss-Prot/TrEMBL database.

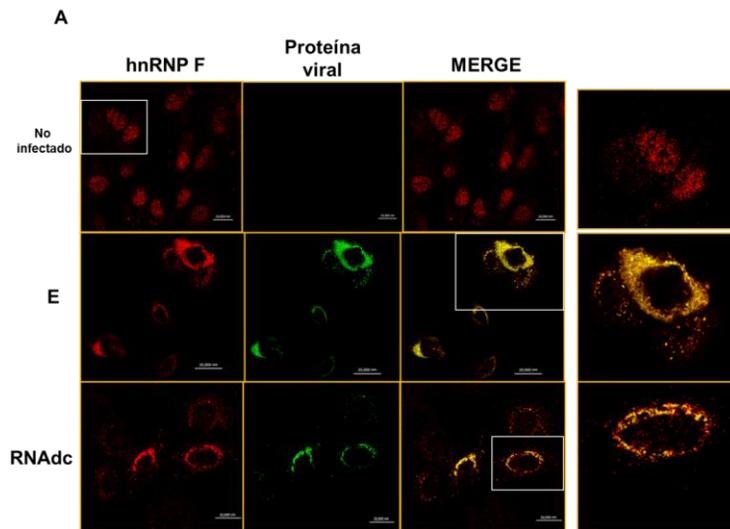
Adicionalmente analizamos la red de interacción proteína-proteína esta fue hecha para identificar la funcionalidad de las proteínas, identificamos 36 proteínas estas proteínas fueron analizadas por el programa STRING 10.0, incluso se observa que no todas la proteínas tienen interacción entre sí, 33 de las proteínas identificadas se encuentran unidas directa o indirectamente, solo 19 se encuentran fuertemente unidas sugiriendo que existe una funcionalidad vinculada (Figura 7) 3 de las 36 proteínas identificadas no se observa ningún tipo de vínculo (STRING score= 0.4).



- Neighborhood
- Gene Fusion
- Cooccurrence
- Coexpression
- Experiments
- Databases
- Textmining
- [Homology]

Al analizar la localización sub-celular de estas proteínas en las células infectadas, observamos una re-distribución de ellas con respecto a las no infectadas (Figura 7). Ambas proteínas tienen en el caso de células no infectadas una localización preferentemente nuclear (Figura 7). Sin embargo, en las células infectadas se observa la salida masiva de ambas del núcleo hacia el citoplasma, además de una clara colocalización con la proteína E y con el RNAdc viral (Figura 7A). La helicasa DDX5 también colocaliza con NS5 (Figura 7B).

Cuando observamos un campo abierto (40X) de las células Huh-7 infectadas con DENV por 48 horas a MOI de 3 corroboramos que esta proteína se traslada del núcleo hacia al citoplasma en todas las células infectadas. Interesantemente, la proteína NS5 es capaz de trasladarse al núcleo y colocalizar con la proteína DDX5 mientras que en las células no infectadas la proteína DDX5 se encuentra completamente en núcleo (Figura 8).



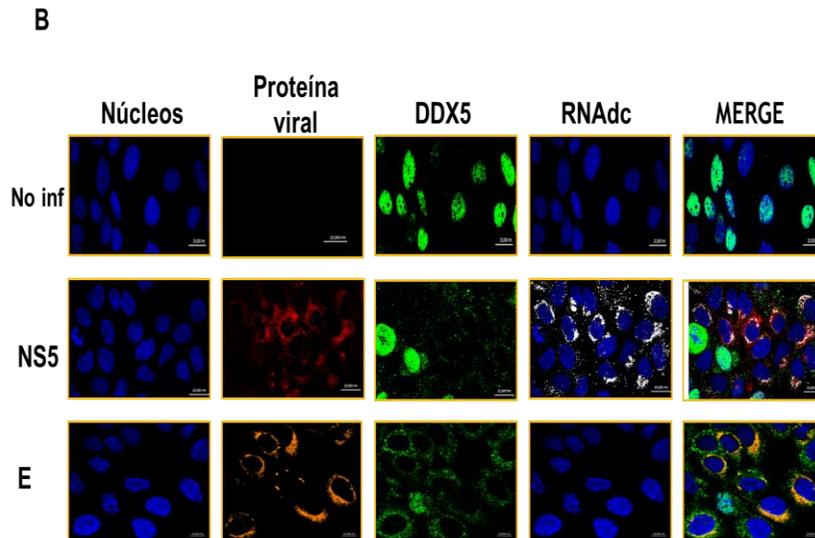


Figura 7. Localización sub-celular de hnRNP F y DDX5 en células infectadas con DENV. Células Huh-7 infectadas con DENV2 fueron fijadas y teñidas con anticuerpos anti-E, anti-RNAdc (verde) y anti hnRNP F (rojo) (A), anti-NS5 (rojo) anti-E (naranja), anti-RNAdc (verde) y anti-DDX5 (blanco) (B). El núcleo fue teñido con Hoescht (azul). La localización de las proteínas fue analizada por microscopia confocal. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

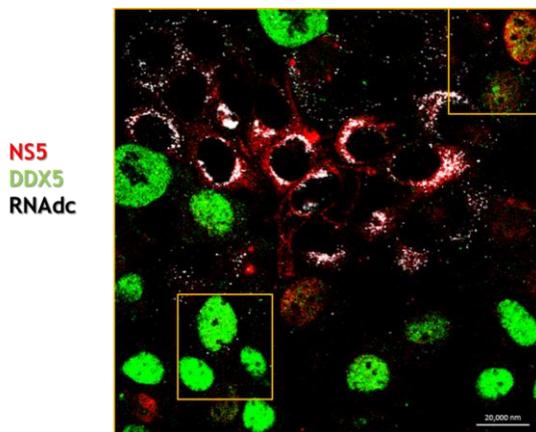


Figura 8. Localización sub-celular de la proteína DDX5 en células infectadas con DENV. Células Huh-7 infectadas con DENV2 fueron fijadas y teñidas con anticuerpos anti-RNAdc (blanco) anti-NS5 (rojo) y anti-DDX5 (verde). La localización de las proteínas fue analizada por microscopia confocal. La imagen es representativa de tres experimentos independientes.

Previamente se ha reportado que la proteína NS5 es capaz de trasladarse al núcleo en las primeras horas de la infección viral ya que posee secuencias de localización nuclear así como de exporte nuclear (SLN y SEN). Estas secuencias son capaces de unirse a α/β importinas así como a la familia de las exportinas CRM-1 para su traslado. Sin embargo, el papel funcional que desempeña la proteína viral en el núcleo no se ha descrito hasta el momento (Rawlinson et al. 2009; Melinda J. Pryor et al. 2007). Se han discutido diferentes hipótesis sobre el papel funcional que tiene esta proteína en el núcleo de las células infectadas una posibilidad es que NS5 sea capaz de modificar componentes celulares importantes para el virus como la cromatina o micro RNA's otra de las posibilidades es que NS5 esté actuando como un acarreador promoviendo la salida de proteínas nucleares requeridas por el virus durante la replicación viral en el retículo endoplásmico, específicamente en la región peri-nuclear. Con el objetivo de determinar si el tiempo en el que la proteína NS5 se moviliza entre el núcleo y el citoplasma correlaciona con el momento de movilización de las proteínas celulares, se realizaron cinéticas de infección y se analizó la localización de las proteínas por microscopia confocal. Para ello, se infectaron células Huh-7 a MOI de 3 en los siguientes tiempos: 8, 10, 12, 16 y 24 hpi. Las células fueron fijadas e incubadas con anticuerpos anti-NS5 y anti-DDX5.

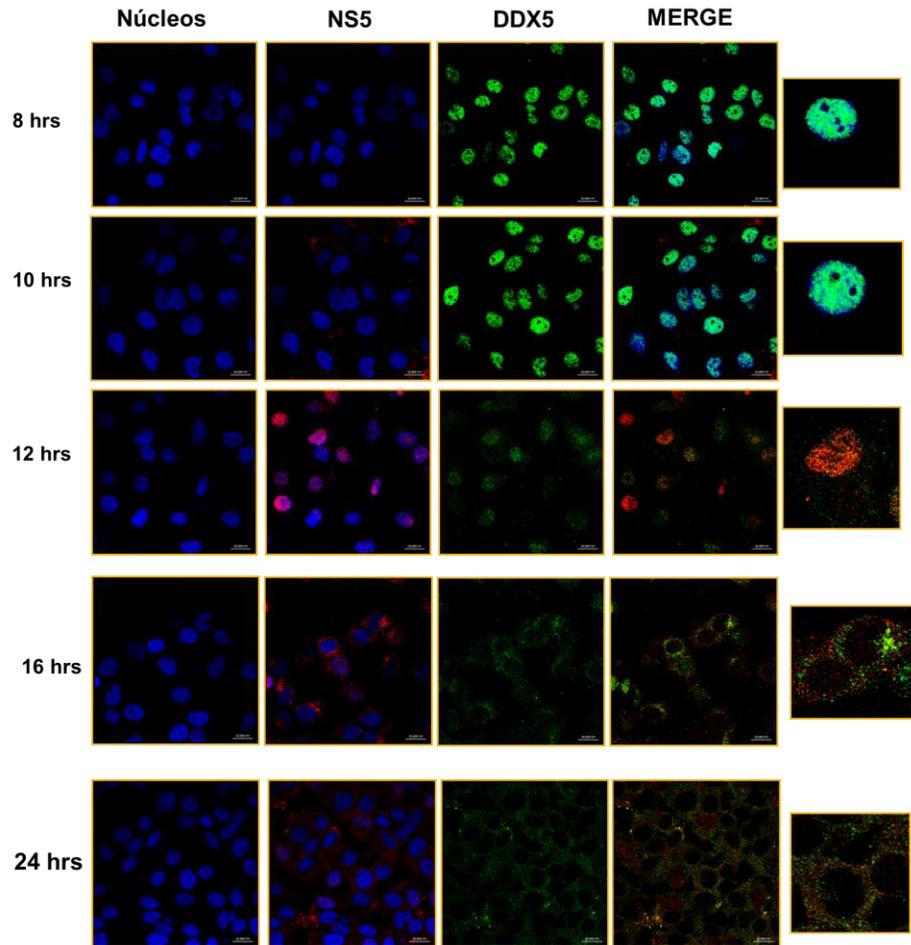


Figura 9. Localización sub-celular de la proteína DDX5 a diferentes tiempos pos infección en células Huh-7. Las células infectadas fueron fijadas a diferentes tiempos e incubadas con diferentes anticuerpos específicos: anti-NS5 (rojo) y anti-DDX5 (verde). La localización de las proteínas fue analizada por microscopia confocal. La imagen es representativa de tres experimentos independientes.

Al evaluar la localización sub-celular de ambas proteínas (NS5 y DDX5) en las células Huh-7 infectadas con DENV pudimos observar que NS5, sintetizada en el citoplasma, se moviliza al núcleo a las 12 hpi. A ese tiempo se puede observar que la proteína celular DDX5 comienza a salir

hacia el citoplasma (Fig 9). La salida de esta proteína nuclear continua a través del tiempo. La proteína viral NS5 se traslada del núcleo hacia el citoplasma a las 16 hpi y a las 24 hpi se puede observar que ambas proteínas están en el citoplasma (Fig 9). Una de las posibilidades es que la proteína viral NS5 sea la que promueva el transporte de la proteína DDX5 hacia el citoplasma específicamente hacia la región perinuclear. Para dilucidar esta posibilidad, las células fueron tratadas con Ivermectina, un fármaco inhibidor del transporte citoplasma-núcleo a través del mecanismo α/β importinas. Diferentes grupos de investigación ya han reportado que este fármaco actúa como inhibidor del transporte a núcleo de NS5 e incluso últimamente se ha considerado como un fármaco antiviral (Fraser et al. 2014; Wagstaff et al. 2012; Melinda J. Pryor et al. 2007). Para evaluar si el tratamiento con Ivermectina tendría algún impacto en la proteína localización de DDX5 el primer paso fue probar diferentes concentraciones del fármaco: 20 μ M y 40 μ M y realizar ensayos de viabilidad. Las células fueron crecidas en ausencia de antibióticos (penicilina y estreptomycin) y pudimos observar que el tratamiento no afectaba la viabilidad celular 6 y 24 horas después del tratamiento, esto al compararlo con el control de vehículo.

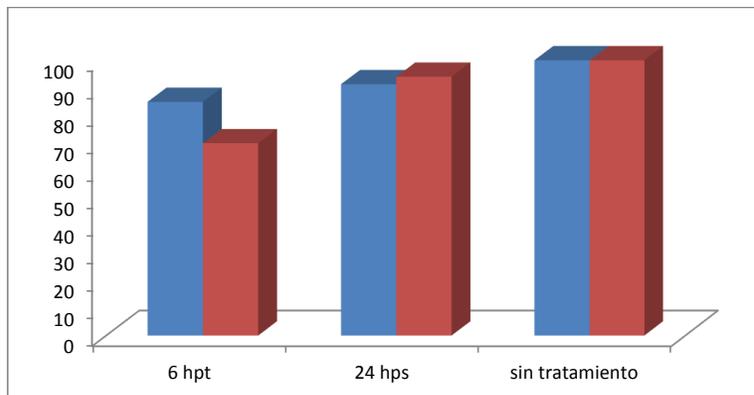


Figura 10. Viabilidad ivermectina. Células Huh-7 fueron tratadas con dos concentraciones diferentes 20 o 40 μ M de ivermectina o con el vehículo.

El siguiente paso fue tratar las células y pasado el tiempo de tratamiento estas fueron infectadas a MOI de 3 con DENV. La localización sub-celular de ambas proteínas (NS5 y DDX5) fue evaluada 24 hpi por microscopia confocal. En las células tratadas con el vehículo podemos ver ambas proteínas en el citoplasma como habíamos observado anteriormente, sin embargo, cuando las células fueron tratadas con 40 μ M de ivermectina se pudo observar que NS5 estaba en el citoplasma y la proteína DDX5 en el núcleo.

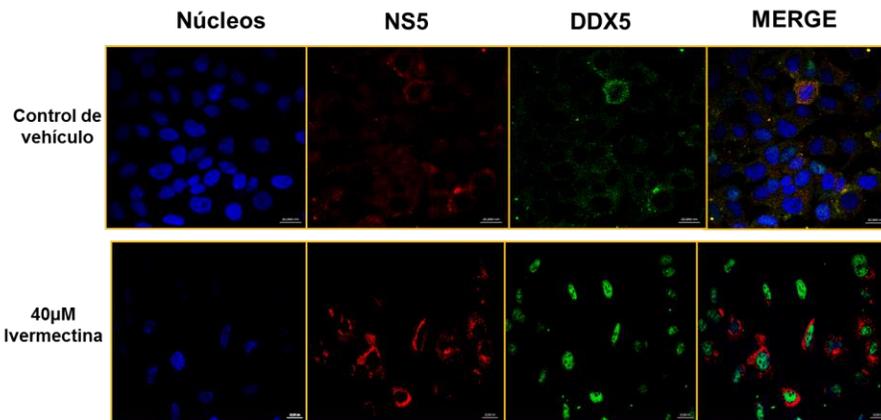


Figura 11. Localización sub-celular de la proteína DDX5 en células tratadas con ivermectina e infectadas con DENV. Células Huh-7 infectadas con DENV2 fueron fijadas y teñidas con anticuerpos anti-DDX5 (verde) anti-NS5 (rojo) y anti-DXX5. La localización de las proteínas fue analizada por microscopia confocal. La imagen es representativa de tres experimentos independientes.

7.2 Proteínas celulares que interaccionan con NS1 en células Huh-7

7.2.1 Purificación de la proteína recombinante NS1

Para identificar las proteínas celulares que interaccionan con la proteína no estructural 1 (NS1) de DENV-2 cepa 16681, la secuencia total de la proteína NS1 fue clonada en el vector vector pCR 2.1 TOPO, después la secuencia fue sub-

clonada dentro de los sitios BamHI y Xho I en el vector de expresión Pproex htb

Figura 12 A. El plásmido recombinante (amablemente donado por el Dr. Juan Ludert) fue sometido a ensayos de restricción para evaluar si el inserto estaba presente de manera clonada correctamente. Al realizar la digestión utilizando las enzimas BamHI y Xho I podemos observar que se liberó el inserto con un tamaño de 1055 pb (Figura 12 B, línea 3), mientras que el fragmento correspondiente a la secuencia de Pproex htb es indicado en mostró un tamaño de 5758 pb (Figura 12 B, línea 2). Una vez que estábamos seguros que el inserto era del tamaño adecuado, el segundo paso fue expresar la proteína recombinante en bacterias *E. coli* BL-21*. La expresión de la proteína NS1r se indujo al agregar IPTG. La correcta expresión de la proteína se evaluó mediante ensayos de Western blot utilizando geles desnaturalizantes (SDS-PAGE) y geles nativos en ambos se realizó la transferencia de las proteínas -estos fueron transferidos a una membranas de nitrocelulosa. La proteína recombinante fue identificada por Western blot usando 2 diferentes anticuerpos policlonales anti-NS1 (anticuerpo policlonal) y anti-his (anticuerpo policlonal). La proteína recombinante NS1r de 55 kDa fue detectada en la fracción soluble (Figura 12 C, D y E, línea 1) y en la fracción insoluble (Figura 12 C, D y E, línea 2) estuvo ausente la proteína se encuentra ausente en el extracto total de bacterias transformadas con el vector vacío (línea 3). Adicionalmente, se realizó el Western blot en condiciones nativas (Figura 12 E). A pensar que esta proteína es capaz de formar dímeros y trímeros hexámeros, podemos observar que en un gel nativo está desolo la forma monomérica ya que fue detectada (reconocimiento del anticuerpo lo vemos en 55 kDa). Una vez que sabíamos que la proteína NS1r había sido expresada fue expresada de manera correcta, ésta se puso a interaccionar con la resina (Talón, clontech) para ser purificada por cromatografía de afinidad. La proteína acoplada a la resina fue lavada cinco veces con Sol. A y cinco veces con imidazol en solución A (imidazol 100-350 mM en sol. A), la pureza de la proteína NS1r fue observada en la línea R (Figura 13 A).

La presencia de NS1r fue confirmada por ensayos de Western blot usando un anticuerpo policlonal α -NS1 (línea R, Figura 13 B).

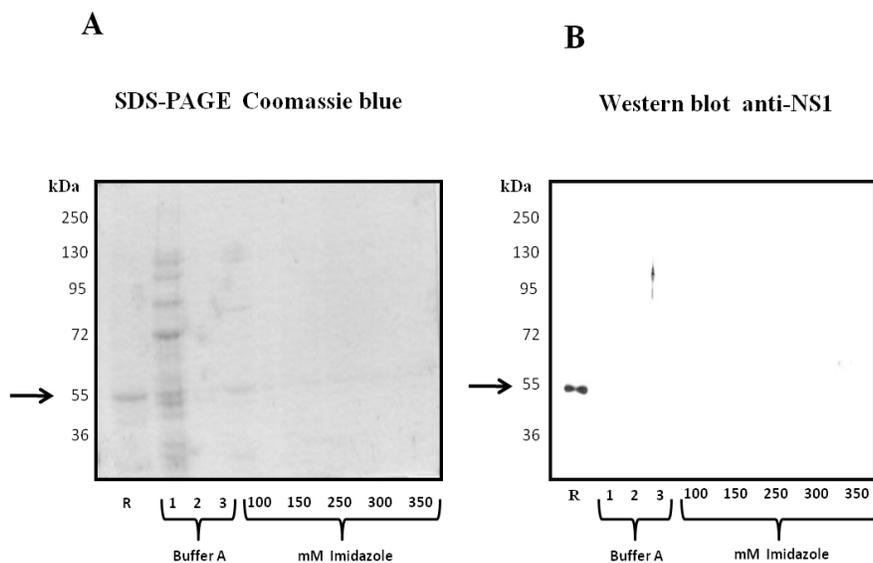


Figura 13. Purificación de la proteína NS1r por cromatografía de afinidad. A) La pureza de la proteína NS1r se muestra en la línea R (resina). Las proteínas presentes en cada fracción fueron analizadas por medio de [electroforesis en SDS-PAGE al 8% teñido con el patrón electroforético fue visualizado por medio de la tinción de azul de coomassie](#). B) La presencia de NS1r fue evaluada usando un anticuerpo anti-NS1. La proteína se muestra [en la fracción R por el anticuerpo anti-NS1 presentó un peso molecular aparente de 55 kDa fue detectada en la fracción R al utilizar un anticuerpo anti-NS1](#).

A ~~h~~a par se realizó el control negativo, ~~para ello,~~ la resina (Talon, Clontech) fue puesta a interactuar con sobrenadante de bacterias transformadas con el plásmido vacío en las mismas condiciones anteriormente descritas, ~~adicionalmente también~~ se realizó el ensayo de purificación de la proteína recombinante donde observamos la ausencia de proteínas de origen bacteriano unidas de manera inespecífica a la resina (Figura 14 A, R). ~~U,~~ un duplicado de este gel fue transferido a membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) para ser evaluado mediante ensayo de Western blot utilizando un anticuerpo contra la proteína NS1 (Figura 9 B) observando que no hay reconocimiento [por parte del anticuerpo](#) (Figura 14 B). ~~E~~ esta resina fue utilizada como control negativo para el ensayo de interacción de proteínas celulares con la proteína recombinante NS1.

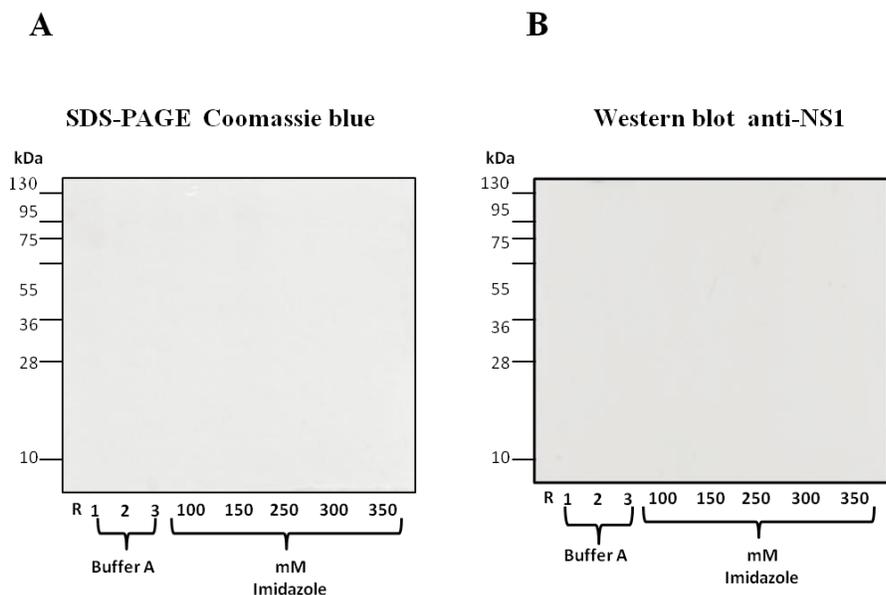


Figura 14. Control negativo de la cromatografía de afinidad. (A) Resina incubada con el extracto total de bacterias transformadas con el vector vacío, las proteínas presente en cada fracción fueron analizadas mediante [electroforesis en un gel SDS-PAGE al 8% y teñido con azul de coomassie](#). B) La presencia de la proteína NS1r fue analizada por ensayos de Western blot usando un anticuerpo específico contra la proteína NS1. [Ninguna banda fue revelada, no se observan bandas](#) en la fracción correspondiente a la resina (fracción R).

7.2.2 Proteínas celulares que interaccionan con NS1 Huh-7

Para aislar proteínas celulares que interaccionan con [la proteína no estructural 1 \(NS1\)](#) se utilizaron dos técnicas diferentes pero complementarias entre sí; por un lado se utilizó cromatografía de afinidad [usando la proteína NS1r como cebo](#) y en otros ensayos de inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo policlonal anti-NS1. Para los ensayos de cromatografía de afinidad la proteína NS1r fue acoplada a una columna de cobalto y como control resina sin NS1r previamente tratada en condiciones iguales a la que sí tiene la NS1r (control negativo descrito anteriormente). [A ambas resinas](#) fueron incubadas por separado con los extractos citoplasmicos de células Huh-7 no infectadas. [D,](#) después de 6 lavados a diferentes concentraciones de NaCl (Figura 15, líneas 1-6) se realizaron 2

eluciones con 1M y 1.5 M de NaCl. ~~L~~ la mayoría de las proteínas que interaccionan con la proteína NS1r fueron obtenidas en la fracción que corresponde a la elución con 1M de NaCl. ~~E~~ estas proteínas están ausentes en la misma fracción en la resina control (Figura 15 B).

La identificación de las proteínas obtenidas en la fracción de elución se realizó por espectrometría de masas (Maldi-Tof). Mediante este método, ~~nos permitió~~ identificamos 80, 70 y 72 proteínas que fueron capaces de interaccionar directa o indirectamente con la proteína NS1r en 3 experimentos independientes por duplicado. ~~Todas ellas ausentes, estas proteínas fueron capaz de interaccionar directa o indirectamente con la proteína NS1r, las proteínas identificadas están ausentes~~ en la resina que se utilizó como control negativo.

Para confirma la interacción directa o indirecta de las proteínas previamente aisladas por cromatografía de afinidad e identificadas por espectrometría de masas se realizaron ensayos de inmunoprecipitación. Las inmunoprecipataciones se realizaron estos fueron hechos utilizando un anticuerpo policlonal anti-NS1 o utilizando IgG de conejo como control negativo. Después, ~~del~~ crosslinking del anticuerpo a la proteína G agarosa (~~se realizó como se ha descrito en~~ materiales y métodos), los inmunocomplejos fueron lavados 5 veces (Figura 16 A y B, líneas 1-5) y las proteínas que interaccionan de manera específica con la proteína NS1 fueron eluidas como se ~~ha descrito~~ describió en la sección de Materiales y Métodos.

Las proteínas obtenidas en la fracción de elución de la inmunoprecipitación interaccionan específicamente con anti-NS1 (unidas de manera directa o indirecta a NS1) ~~porque ninguna de estas no se encontraron presentes proteínas fue encontrada~~ en la fracción de elución control (IgG) (Figuras 16 A y B, línea E). Las proteínas inmunoprecipitadas ~~fueron identificadas~~ por espectrometría de masas (Maldi-Tof) ~~identificando fueron~~ 70, 86 y 85 ~~proteínas en tres experimentos independientes~~. Se consideraron como interacciones específicas aquellas proteínas presentes en los ~~3~~ experimentos independientes (Tabla 3).

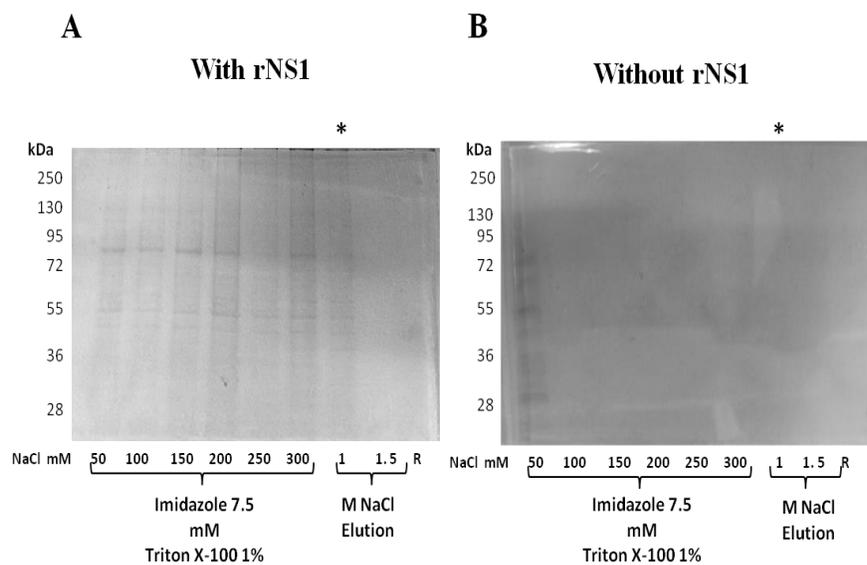


Figura 15. Obtención de proteínas celulares que interaccionan con la proteína NS1r por cromatografía de afinidad. Extractos citoplasmicos de células Huh-7 fueron incubados con la resina (TALON, Clontech) la cual tiene acoplada la proteína NS1r (A) o con la resina sin la proteína NS1r empleada como control negativo (B). Las proteínas celulares presentes en cada fracción fueron analizadas mediante un gel SDS-PAGE al 10% y teñidas con azul de Coomassie. Las proteínas presentes en la fracción [de elusión](#) (1M de NaCl) fueron identificadas por espectrometría de masas MALDI-ToF. * marca la fracción de la elución utilizada para llevar a cabo la identificación.

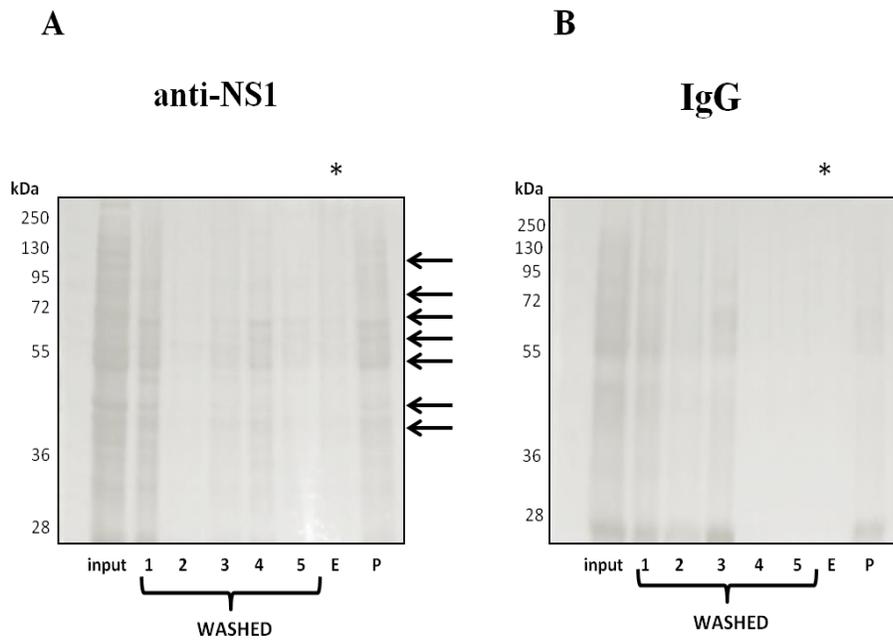


Figura 16. Inmunoprecipitación de las proteínas que interaccionan con NS1 en extractos de células Huh-7. (A) ~~Después las perlas fueron lavadas 5 veces con buffer para IP~~ las proteínas inmunoprecipitadas fueron eluidas de las perlas y analizadas ~~por medio de un~~ por electroforesis en gel SDS-PAGE al 10%. ~~La~~ ~~subsecuente~~ identificación ~~de las proteínas~~ se realizó mediante espectrometría de masas (Maldi-Tof). (B) Control negativo IgG de conejo sujeto a las mismas condiciones de trabajo.* marca la fracción de elución la cual fue utilizada para la identificación de las proteínas. E) elución, P) proteína G-agarosa después de los lavados.

Tabla 3. Proteínas aisladas e identificadas por espectrometría de masas (Maldi-ToF)

Proteína identificada	Mascot score	# Peptide sequences indentified	String Accession #
26S protease regulatory subunit 4	39	3	PSCM1
28S ribosomal protein S15, mitochondrial	37	1	MRPS15
40S ribosomal protein S13	27	1	RPS13
40S ribosomal protein S14	81	1	RPS14
40S ribosomal protein S15	39	1	RPS15
40S ribosomal protein S15a	38	1	RPS16
40S ribosomal protein S16	63	1	RPS16
40S ribosomal protein S18	56	5	RPS18
40S ribosomal protein S2	68	3	RPS2
40S ribosomal protein S23	115	1	RPS23
40S ribosomal protein S24	75	3	RPS24
40S ribosomal protein S25	82	1	RPS25
40S ribosomal protein S3a	150	5	RPS3A
40S ribosomal protein S4, X isoform	108	5	RPS4
40S ribosomal protein S5	30	3	RPS5
40S ribosomal protein S6	31	1	RPS6
40S ribosomal protein S8	87	2	RPS8
60S ribosomal protein L11	39	4	RPL11
60S ribosomal protein L13	71	3	RPL13
60S ribosomal protein L14	94	2	RPL14
60S ribosomal protein L17	40	1	RPL17
60S ribosomal protein L18	104	2	RPL18
60S ribosomal protein L18a	63	3	RPL18A
60S ribosomal protein L19	41	3	RPL19
60S ribosomal protein L21	50	2	RPL21
60S ribosomal protein L23a	27	1	RPL23A
60S ribosomal protein L24	108	2	RPL24
60S ribosomal protein L26	31	1	RPL26
60S ribosomal protein L27a	80	1	RPL27A
60S ribosomal protein L31	39	1	RPL31
60S ribosomal protein L36	60	2	RPL36
60S ribosomal protein L7	68	1	RPL7
Ankyrin repeat and KH domain-containing protein 1	61	2	ANKHD1
Cofilin-1	31	1	CFL1

Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	47	5	DYNC1H1
Elongation factor 1 alpha 1	93	3	EEF1A1
Glucose-6-phosphate isomerase	37	1	GPI
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	59	1	GAPDH
GTP-binding protein Di-Ras2	47	1	DIRAS2
Heat shock cognate 71 kDa protein	73	2	HSPA8
Heat shock protein beta-1	114	1	HSPB1
Heat shock protein HSP 90-beta	55	1	HSP90AB1
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	43	1	HNRNPF
Histone H2B type 1-A	38	2	HIST1H2BA
Histone H2B type 1-B	61	4	HIST1H2BB
Histone H3.3C	38	2	H3F3C
Histone H4	50	2	HIST1H4H
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	53	2	IGF2BP2
Oxidoreductase NAD-binding domain-containing protein 1	38	2	OXNAD1
Peroxiredoxin-1	34	2	PRDX1
Plectin	86	13	PLEC
Protein FAM132A	34	1	FAM132A
Pyruvate kinase PKM	38	3	PKM2
Serine/threonine-protein kinase Chk1	30	1	CHEK1
Serine/threonine-protein kinase SIK3	40	1	SIK3
Tetratricopeptide repeat protein 21B	39	1	TTC21B
Tubulin alpha-1A chain	239	6	TUBA1A
Tubulin alpha-4A chain	42	5	TUBB6
Tubulin beta chain	297	7	ENSG0000
Tubulin beta-2A chain	81	5	TUBB2A
Tubulin beta-3 chain	224	6	TUBB2C
Tubulin beta-4B chain	247	8	TUBA4A
Tubulin beta-6 chain	149	7	TUBB6
Vimentin	1179	38	VIM

7.2.3 Caracterización funcional de las proteínas celulares que interaccionan con NS1

En un intento por clasificar y caracterizar las proteínas celulares identificadas que interaccionan con NS1, se categorizaron de acuerdo a su función y localización sub-celular basándonos en la base de datos Swiss-Prot TrEBL. ~~Las, un total de 64 proteínas identificadas fueron categorizadas en 6 diferentes procesos biológicos: 33 de las 64 proteínas identificadas están involucradas en traducción; 8 de las 64 proteínas identificadas pertenecen a microtubulos; 4 de las 64 proteínas identificadas están involucradas en formación del nucleosoma y glucolisis; 3 de las 64 proteínas están involucradas en respuesta a estrés y 2 de las 64 proteínas~~

están involucradas en transporte celular (Tabla 3). Algunas de las proteínas identificadas son proteínas de citoplasma (23.2%), el 48.2% corresponde a las proteínas ribosomales ~~(48.2%)~~, interesantemente 8.9% de las proteínas identificadas son de núcleo mientras que el 1.7 % ~~de las proteínas~~ son de mitocondria y el 3.5% son proteínas de membrana (Figura 17). Adicionalmente, analizamos la red de interacción proteína-proteína ~~esta fue hecha para identificar la funcionalidad de las proteínas, mediante identificamos 64 proteínas estas proteínas fueron analizadas por~~ el programa STRING. Se puede, incluso se observar que no todas la proteínas tienen interacción entre sí, 30 de las proteínas identificadas se encuentran fuertemente unidas directa o indirectamente sugiriendo que existe una funcionalidad vinculada (Figura 18). Cuarenta y tres ~~43~~ de las 64 proteínas identificadas fueron interconectadas mientras que 12 ~~de las proteínas~~ no muestran ~~observa~~ ningún tipo de vínculo (STRING score= 0.4).

Tabla 4. Clasificación biológica de las proteínas celulares que interaccionan con NS1

Biological Process	Proteins
Microtubule based process	8
Translation	33
Nucleosome assembly	4
Glycolysis	4
Stress response	3
Transport	2
Other process	12

Tabla 4. Clasificación biológica de las proteínas celulares que interaccionan con NS1. Para investigar el proceso biológico y la vía de señalización en la que participan las proteínas aisladas e identificadas que interaccionan con NS1 utilizamos la base de datos DAVID Bio-informatics Resources (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) y las proteínas también fueron analizadas en la base de datos REACTOME pathway database (<http://www.reactome.org>).

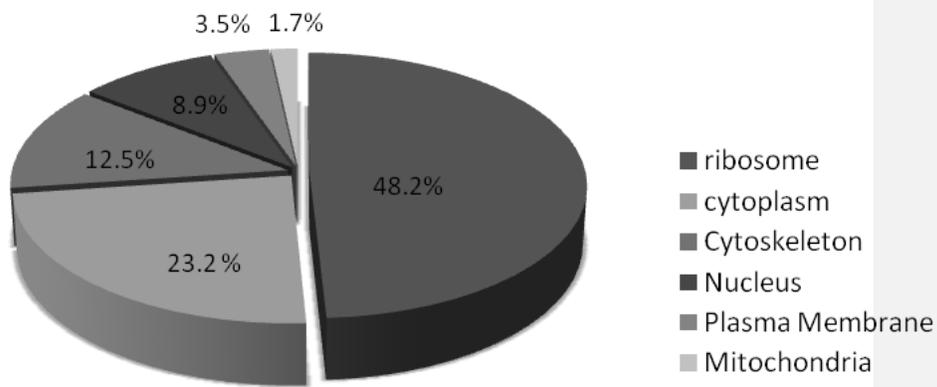


Figura 17. Localización sub-celular de las proteínas celulares que interaccionan con NS1 identificadas por espectrometría de masas. La localización sub-celular de las proteínas que

interaccionan con NS1 fue analizada usando el programa bioinformatico Swiss-Prot/TrEMBL database.

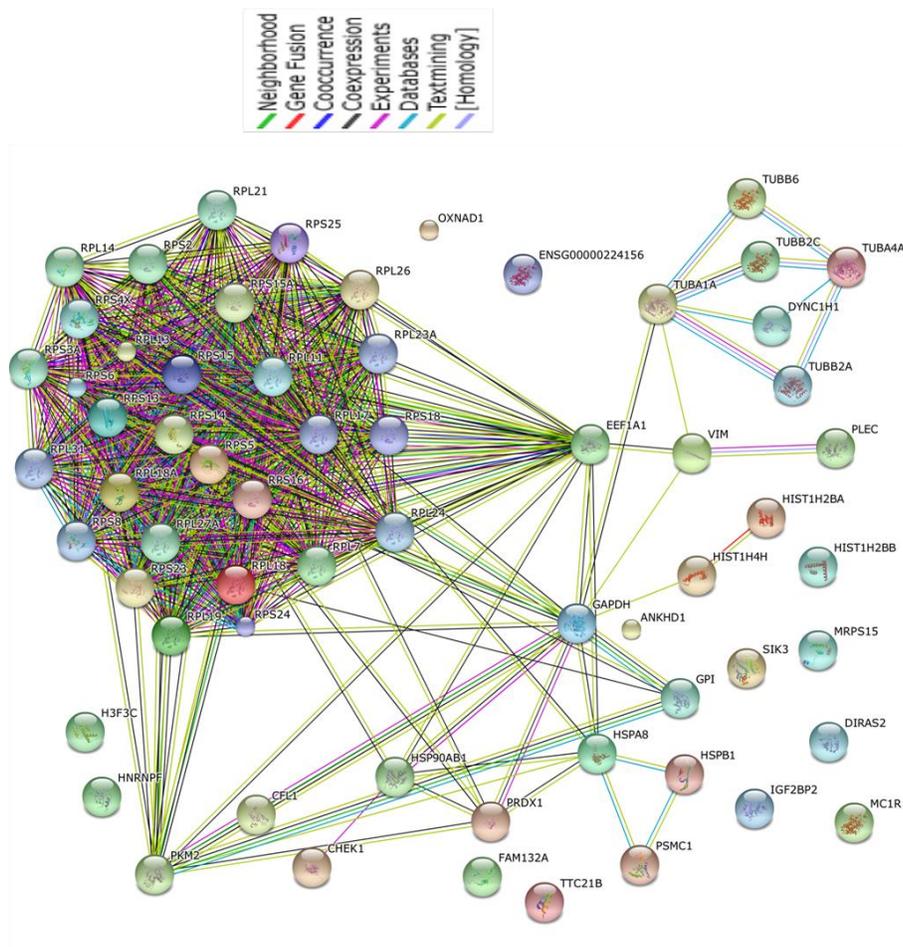


Figura 18. Red de interacción proteína-proteína de las proteínas identificadas que interactúan con NS1. La red contiene 64 proteínas el mapa de interacción se realizó utilizando la base de datos STRING versión 9.05, el color de la línea indica el tipo de evidencia que soporta la interacción.

7.3 La proteína NS1 interactúa con las proteínas celulares RPL18a, RPL18 y GAPDH en células Huh-7 infectadas

Para validar que las proteínas aisladas e identificadas por cromatografía de afinidad e inmunoprecipitación ~~las proteínas que~~ interactúan directa o indirectamente con la proteína NS1 de DENV-2, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación.

Específicamente analizamos dos proteínas ribosomales: RPL18a y RPL18 y la enzima metabólica GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa). ~~fueron analizadas por ensayos de co-inmunoprecipitación.~~ Extractos citoplásmicos de células Huh-7 infectadas fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-NS1, anti-GAPDH, anti-RPL18a y anti-RPL18, la fracción que contiene los inmunocomplejos fue analizada mediante ensayos de Western blot usando anticuerpos específicos contra la proteína NS1, RPL18a y RPL18. Los extractos también fueron inmunoprecipitados con anti-GAPDH, anti-RPL18a, anti-RPL18 y el western blot analizado con anti-NS1.

El ensayo de co-inmunoprecipitación reveló la presencia de las proteínas ribosomales RPL18a (18 kDa) y RPL18 (22kDa) así como de la enzima metabólica GAPDH (38kDa), entre las proteínas inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-NS1 (55 kDa) ~~se detectó a la proteína NS1, GAPDH, RPL18a y RPL18~~ (Figura 19). De la misma manera, la proteína NS1 fue precipitada con anticuerpos anti-RPL18, RPL18a y GAPDH, ~~estos resultados confirman la interacción entre estas proteínas y la proteína viral no estructural NS1~~ validando los resultados obtenidos

por cromatografía de afinidad e inmunoprecipitaciones seguida por la identificación mediante espectrometría de masas.

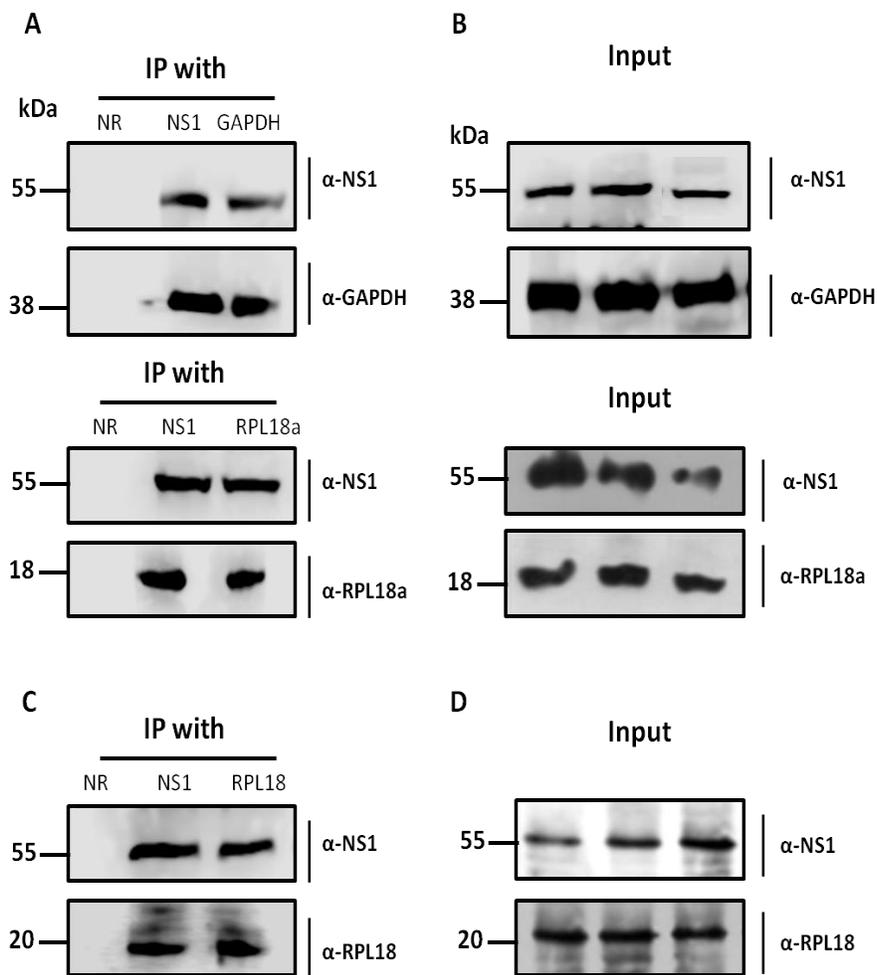


Figura 19. NS1 interacciona con las proteínas celulares GAPDH, RPL18a y RPL18. Extractos de células Huh-7 infectadas fueron inmunoprecipitados con anti-NS1 (paneles A y C) anti-GAPDH y anti RPL18a (panel A) o anti-RPL18 (panel C). Las proteínas inmunoprecipitadas (panel A y C) fueron separadas en un gel SDS-PAGE al 10% y analizadas por Western blot usando un anticuerpo anti-NS1 (panel A y C), anti-GAPDH anti-RPL18a (panel A) o anti-RPL18 (panel C), la presencia de todas las proteínas fue evaluada en el input (panel B y D) NS1, GAPDH y RPL18a (panel B) y NS1 y RPL18 (panel D).

Interesantemente aproximadamente el 50% de las 64 proteínas identificadas fueron proteínas ribosomales, la función principal de estas proteínas es la traducción del RNAm, sin embargo, es bien sabido que varias de las proteínas ribosomales también tienen funciones extra-ribosomales como se ha reportado para las proteínas RPL18a, RPL18, RPS31 y RPL7 (Bhavsar et al. 2010). Las funciones extra-ribosomales descritas para estas proteínas incluyen unión del ribosoma al retículo endoplasmico, ciclo celular, apoptosis, etc. Sin embargo, se ha descrito que hits para el silenciamiento de las proteínas ribosomales RPL18 y RPL7 está bien establecido mediante ensayos de screening con siRNA inhiben la replicación de virus de la fiebre amarilla y del virus fiebre del oeste del Nilo sugiriendo que las proteínas ribosomales son requeridas en las infecciones virales.

Para evaluar los niveles de expresión y la localización de las proteínas RPL18a, RPL18 y GAPDH durante la infección se realizaron ensayos de Western blot e inmunofluorescencias en células Huh-7 infectadas a una MOI de 3 a 6, 24 y 48 hpi. Extractos totales de células infectadas con no infectadas o mock (M), e infectadas con virus inactivo con luz UV (IV) o con DENV (INF) fueron usadas, la expresión de los niveles de GAPDH (Figura 16, panel A y B), RPL18a (Figura 20, panel A y C) y RPL18 (Figura 20, panel A y D) no se alteran durante la infección con el DENV o con virus inactivo con luz UV (IV). C como control de infección se midió a la proteína NS3 (70 kDa). P, para confirmar determinar si que las proteínas celulares evaluadas modificaban no alteran su expresión en el ciclo replicativo de DENV. Para esto, se realizó el análisis cuantitativo de las tres proteínas en tres experimentos independientes por duplicado por Western-blot normalizando con actina como control de carga.

No se observó una diferencia estadísticamente significativa en la cantidad detectada de las proteínas analizadas en células infectadas en relación a la condición control (mock), (Figura 20 A-D) [GAPDH ($p=0.090$), RPL18a ($p=0.158$) y RPL18 ($p=0.588$)].

~~Con el fin de~~Para analizar ~~si~~ la localización sub-celular de GAPDH, RPL18 ~~se modifica durante la infección, las~~ en células Huh-7 infectadas a una MOI de 3 por 48 hpi fueron incubados con anticuerpos específicos contra cada proteína y analizados por microscopia confocal.

Aunque nosotros no detectamos diferencia significativa en los niveles de expresión de GAPDH y RPL18 por Western blot usando extractos totales, sí observamos una distribución diferente de estas proteínas en las células infectadas (Figura 21). Mientras que la proteína GAPDH se observa con una distribución puntual en células no infectadas, en las células infectadas se observa una distribución dispersa (Figura 21, panel A). ~~En el caso de~~para la proteína GAPDH no ~~fue~~ posible detectar colocalización con NS1.

~~Por otro lado, la~~ distribución de la proteína RPL18 se observó ~~una distribución dispersa~~ en el citoplasma en células no infectadas; ~~sin embargo, en células infectadas se observó la~~ observamos ~~la~~ relocalización ~~de la proteína~~ hacia la región perinuclear ~~en las células infectadas~~ (Figura 21, panel B). ~~La~~ colocalización de NS1 y E con la proteína ribosomal 18 (RPL 18) se puede observar en el “merge”.

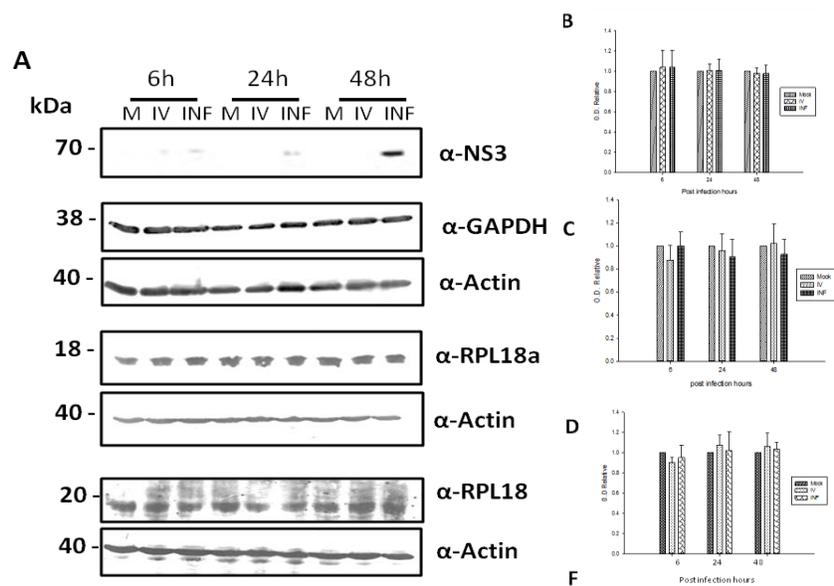


Figura 20. Niveles de expresión de las proteínas celulares GAPDH, RPL18a y RPL18 en células infectadas. Extractos totales de células Huh-7 mock (M) o infectadas con virus inactivo con luz UV (IV) o con DENV (INF) a diferentes tiempos post-infección (6, 24 y 48 horas), fueron analizados por Western-blot usando anticuerpos anti-GAPDH, anti-RPL18a y anti-RPL18 (A) anti-NS3 fue utilizado para demostrar la infección por dengue. Anti-actina fue utilizado como control de carga. Análisis densitométrico de 3 experimentos independientes para (B) GAPDH ($p=0.090$), (C) RPL18a ($p=0.158$) y (D) RPL18 ($p=0.588$).

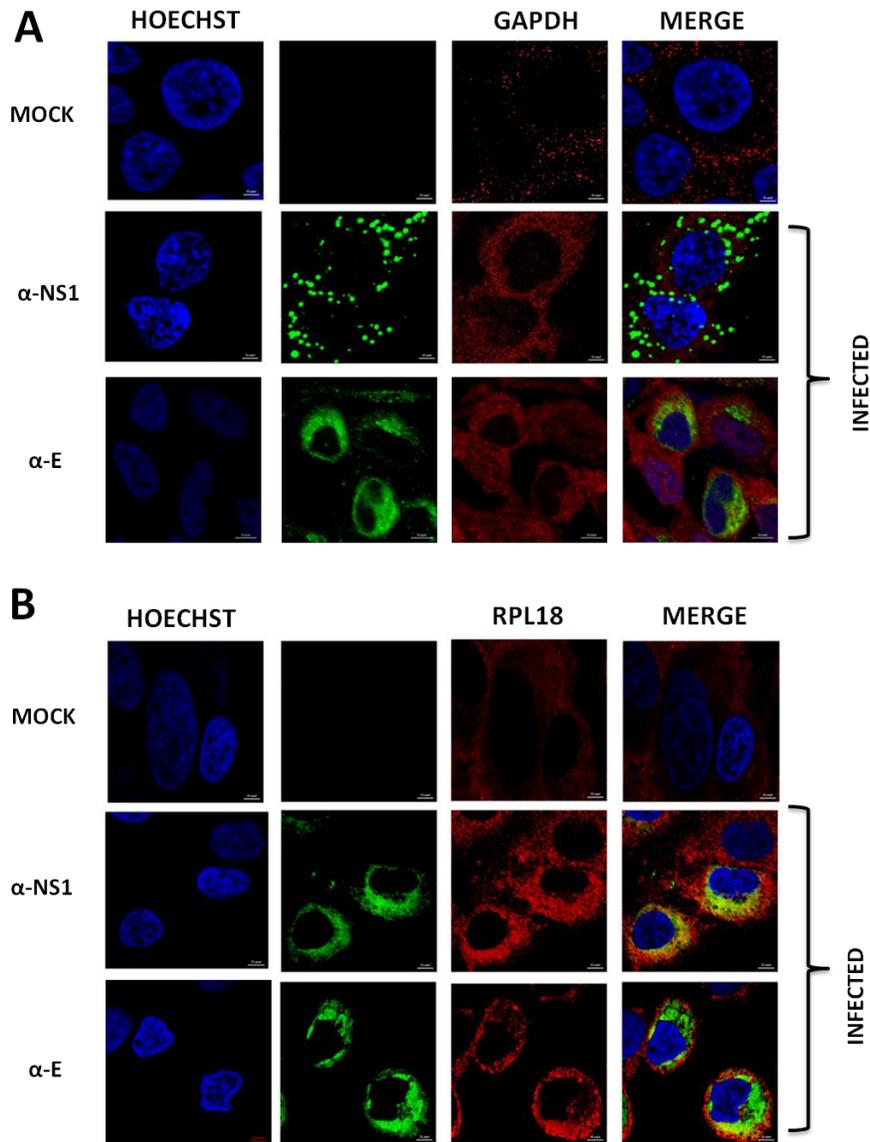


Figura 21. Localización sub-celular de GAPDH y RPL18 en células infectadas con DENV. Células Huh-7 infectadas con DENV2 por 48 hpi fueron fijadas y teñidas con anticuerpos anti-E, anti NS1 (verde) y anti-GAPDH (A) y anti-RPL18 (B) (rojo). El núcleo fue teñido con Hoescht (azul). La localización de las proteínas fue analizada por microscopía confocal. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

7.5 Silenciamiento de la proteína ribosomal RPL18

Una de las proteínas ~~identificadas~~ que interaccionan con NSs1 en la infección por DENV es la proteína ribosomal RPL18, aunque esta proteína no cambia su expresión durante la infección, sí cambia su ~~redistribución~~. Con el fin de ~~en el ciclo replicativo viral~~, determinar si la proteína RPL18 participa en el ciclo replicativo de DENV, decidimos silenciar su expresión mediante siRNA. Debido a la abundancia de las proteínas ribosomales, el primer paso fue estandarizar las concentraciones ideales del siRNA para silenciar que la proteína ribosomal disminuya su expresión y además la célula sea viable sin alterar la viabilidad celular y su metabolismo. Para lograr un buen silenciamiento de RPL18, iniciar con el silenciamiento las células Huh-7 fueron crecidas y transfectadas en suspensión, después fueron transfectadas con dos diferentes concentraciones de siRNA específico (siRNA-RPL18) 100_nM y 150_nM o con 150_nM de un siRNA no relacionado (control). Venticuatro 24 horas después, las células Huh-7 que crecen en monocapa fueron re-transfectadas con la misma concentración de los dos siRNAs. Los y los niveles de proteína RPL18 fueron medidos 24 y 48 horas de la segunda transfección. B, bajo estas condiciones, podemos observar que la proteína RPL18 disminuyóe su expresión en un 40% aproximadamente a las 24hpt, mientras que a las 48 hpt se puede observar disminución de un 84% aproximadamente. S, sin embargo, el silenciamiento de esta proteína se revierte a las 72 hpt observando aumento en la expresión de esta aproximadamente de 60% (Figura 22). Así, los datos nos muestran que el silenciamiento máximo de la proteína PRL18 fue es a las 48hpt, sin embargo, a las 24 hpt ya se encuentra silenciada más del 50% de la proteína, lo que nos hace pensar que esto nos genera la venta de infección para que las células sean infectadas 24 hpt permitiendo la infección por 48 horas y así obtener el sobrenadante y extractos celulares. Es bien sabido el impacto que tienede las proteínas ribosomales tienen en el proceso de traducción celular, sin embargo, el silenciamiento de estas proteínas no siempre afectan la viabilidad ni la traducción celular. Para evaluar si el silenciamiento de esta proteína pudiera afectar la viabilidad así como el metabolismo celular de las células transfectadas, se les realizó ensayos de

viabilidad, tinción con nitrato de plata e incorporación de [³⁵S]-Met para determinar si las células se encontraban metabólicamente estables. Las células transfectadas con siRNA RPL18 o con el siRNA control no reducen-modifican su viabilidad celular a 48 y 72 hpt (Figura 23, panel A). A, además la traducción de los RNAm celulares no se ve afectada 48 y 72 hpt al hacer la tinción del patrón electroforético con nitrato de plata de las células transfectadas con el siRNA RPL18 o con el siRNA no relacionado a 48 y 72 hpt (Figura 23, panel B). A adicionalmente se realizó la incorporación de [³⁵S]-Meth en las dos condiciones a 48 y 72 hpt (Figura 23, panel C). Estos ensayos nos demuestran que el silenciamiento de la proteína ribosomal RPL18 no altera la viabilidad celular ni la eficiencia en la traducción de los RNAm.

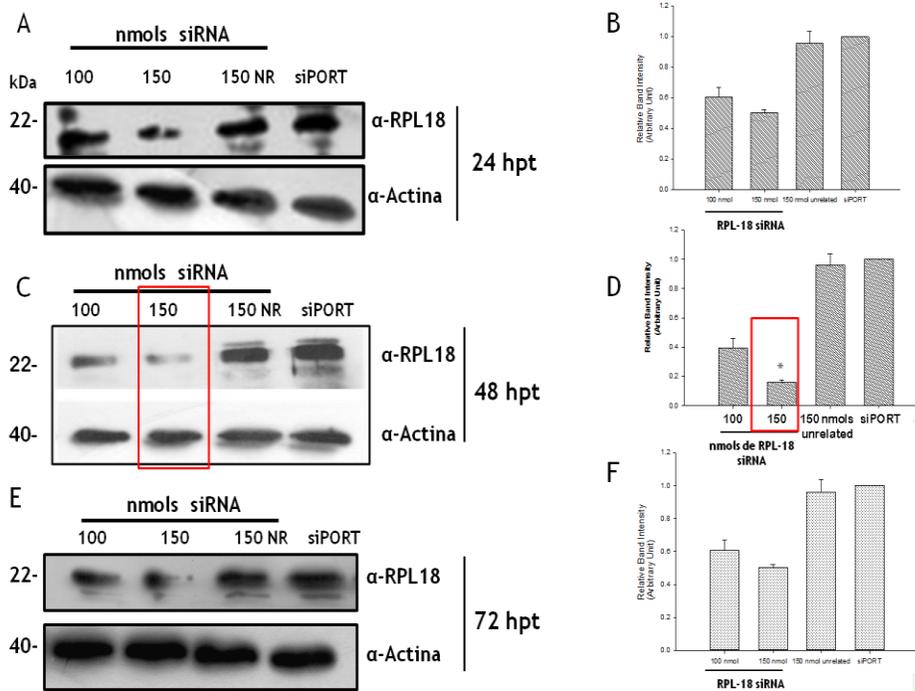


Figura 22. Silenciamiento de la proteína ribosomal RPL18. Células Huh-7 transfectadas con 100 o 150 nM de siRNA RPL18 o con 150 nM de siRNA no relacionado además solo con el reactivo de transfección siPORT. E, le extracto total de las diferentes condiciones fue analizado por ensayo de Western blot utilizando anticuerpo específico contra la proteína ribosomal RPL18. E

anticuerpo anti-actina fue utilizado como control de carga. A 24 hpt se puede observar la disminución de proteína en un 40% (panel A), 48 hpt se puede observar disminución en la expresión de la proteína del 80% (panel C) y finalmente el silenciamiento de la proteína se inicia a revertir a las 72 hpt (panel E). El análisis densitométrico de tres experimentos independientes fue hecho (panel B, D y F) * $p < 0.05$. El recuadro marca el tiempo y la concentración donde el silenciamiento máximo es alcanzado.

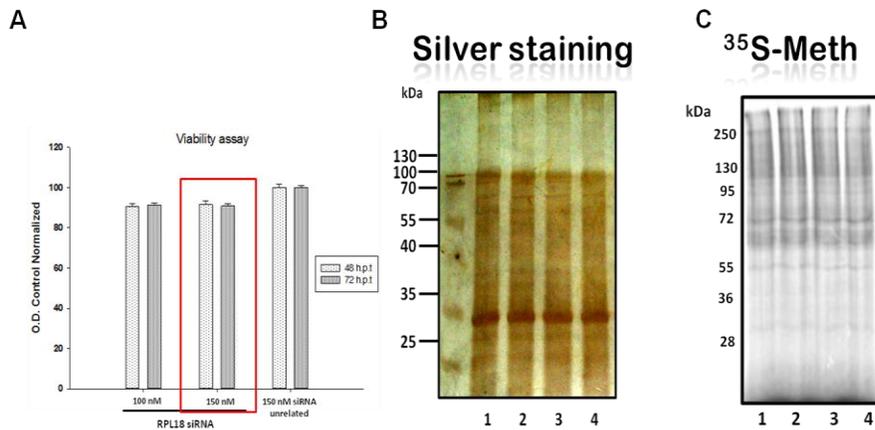


Figura 23. El silenciamiento de la proteína ribosomal RPL18 no altera la viabilidad ni el metabolismo celular. Células Huh-7 fueron transfectadas con o 150 nM de siRNA RPL18 o con 150 nM de siRNA no relacionado. Ensayo de viabilidad celular (A) tinción con nitrato de plata e incorporación a las proteínas celulares de metionina S^{35} fue hecho 48 y 72 hpt (B y C), carriles 1 y 3 son extractos de células huh-7 transfectadas con 150 nM del siRNA RPL18 (24 y 48 hpt respectivamente) mientras que los carriles 2 y 4 son células Huh-7 transfectadas con el siRNA control (24 y 48 hpt respectivamente). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

7.6 RPL18 es requerida durante la infección con DENV

Una vez que las condiciones del silenciamiento fueron establecidas, las células transfectadas con el siRNA RPL18 o con el siRNA control fueron infectadas con DENV-2, con el objetivo de evaluar cuatro parámetros: rendimiento viral por ensayos de plaqueo obtenidos del sobrenadante, secreción de NS1 utilizando ensayos de ELISA, expresión de proteínas virales mediante ensayos de Western-blot y inmunofluorescencias, los niveles de RNAv fueron medidos por qPT-PCR.

El sobrenadante fue colectado 48 hpi de las células transfectadas con 100 y 150 nM del siRNA RPL18 o con 150 NM del siRNA control, detectado reducción del rendimiento viral de 1 y 1.5 logs respectivamente al compararlos con el control

(células transfectadas con el siRNA no relacionado) sugiriendo que la proteína ribosomal se encuentra involucrada en el ciclo replicativo viral (Figura 24, panel A).

Estos datos se vieron apoyados por la reducción en la cantidad de NS1 secretada al sobrenadante en las células transfectadas con 150 nM de siRNARPL18 al comparar con las células transfectadas con 150 nM del siRNA control (Figura 24, panel B). El silenciamiento de la proteína ribosomal RPL18 disminuy~~ó~~e significativamente ~~notablemente~~ el rendimiento viral así como la cantidad de NS1 secretada al sobrenadante. Para confirmar el efecto inhibitorio en la infección debido al silenciamiento de RPL18, ~~le~~ los niveles de expresión de otras proteínas virales fueron medidos en células transfectadas con el siRNA RPL18. La ~~la~~ reducción significativa en la cantidad de las proteínas virales E (verde) y NS1 (naranja) a 24 hpi pudo confirmarse ~~se puede observar~~ por ensayos de inmunofluorescencia y Western blot ~~después del silenciamiento de RPL18 en comparación con las células transfectadas con el siRNA control.~~ Las células transfectadas con el siRNA específico se observa ~~disminución en la cantidad de las proteínas virales E (verde) y NS1 (naranja) a 24 hpi en comparación con las células transfectadas con el siRNA control.~~ (Figura 24, panel C). Esta reducción fue confirmada mediante ensayos de Western blot al evaluar la reducción de las proteínas no estructurales NS3 y NS5 en células transfectadas con el siRNA RPL18 comparando la cantidad de estas proteínas con los extractos celulares de las células transfectadas con 150 nM del siRNA control (Figura 24, panel D). confirmando que la proteína ribosomal RPL18 está involucrada en el ciclo replicativo de DENV, ~~A~~ adicionalmente, se observó la reducción de 1 log en los niveles de RNAv esto fue medido por qRT-PCR en ambas condiciones, las células transfectadas con el siRNA específico con respecto a y las transfectadas con el siRNA control fueron ~~lisadas a las~~ 48 hpi (Figura 24, panel E). para la obtención del RNA total observando que en la células transfectadas con el siRNA específico hay ~~disminución significativa al comparar los resultados con el control,~~ con estos datos, confirmamos la participación de la proteína ribosomal RPL18 en

el ciclo replicativo de DENV. ~~Con el fin de determinar la~~ ~~Para confirmar la~~ participación de la proteína ribosomal RPL18 en ~~el ciclo~~ replicación y traducción viral ~~empleamos otra estrategia experimental~~, utilizamos células Vero establemente transfectas con el replicón de DENV4 el cual codifica para el gen reportero de luciferasa (generosamente donadas por Dr. Padmanabhan, Georgetown University Washington DC). ~~Las células Vero-R4~~ ~~las células~~ fueron transfectadas con 100 nM y 150 nM de siRNA RPL18 o con 150 nM de siRNA control, ~~4824~~ y ~~7248~~ hpt se midió la actividad de luciferasa. ~~A, lasa 4824~~ hpt se observó ~~reducción~~ ~~disminución~~ en la ~~concentración~~ ~~expresión de luciferasa~~ ~~dependiente~~ de 0.5 a 1 log ~~en la actividad de luciferasa fue observada en las células~~ transfectadas con 100 nM y 150 nM del siRNA RPL18 respectivamente (Figura 25, panel B), ~~mientras que a las 7248~~ hpt el efecto se ~~poduede~~ observar de manera más dramática ~~se observandose~~ reducción de más de 1 log en la actividad de luciferasa en la células transfectadas con 150 nM de siRNA RPL18 al comparar con el control no relacionado. Ninguna de las concentraciones de siRNA empleadas ~~comprometióe~~ la viabilidad celular (Figura 25, panel A). Con estos resultados concluimos que la proteína ribosomal participa modulando de manera positiva el ciclo replicativo viral.

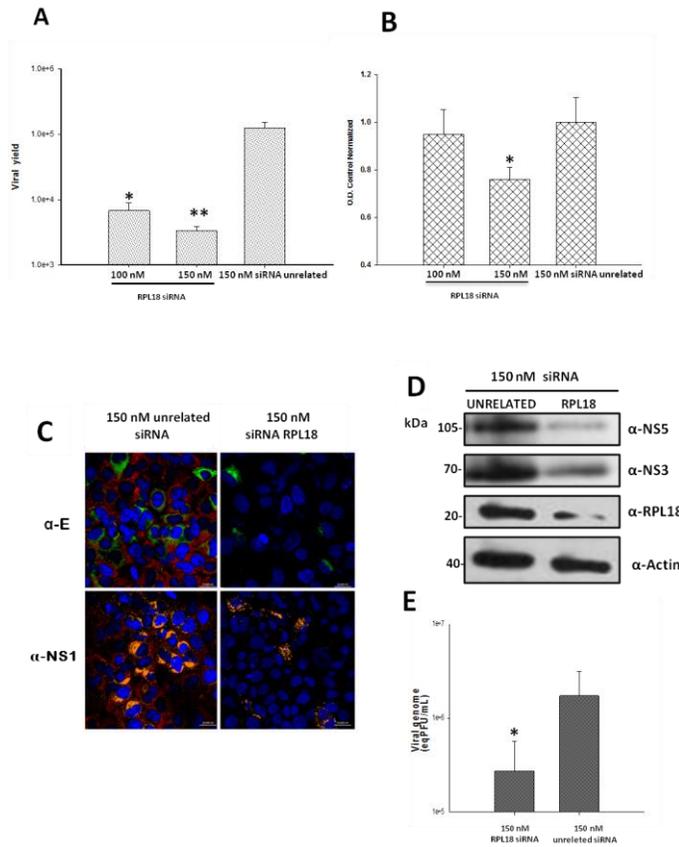


Figura 24. El silenciamiento de la proteína ribosomal RPL18 inhibe la infección por DENV. Células Huh-7 transfectadas con 100 o 150 nM de siRNA RPL18 o con 150 nM de siRNA no relacionado e infectadas. Rendimiento viral fue medido por ensayos de plaqueo (A) los niveles de secreción de NS1 por ELISA (B). El rendimiento viral fue expresado midiendo +- SEM de UFP/ml de tres experimentos independientes. La secreción de NS1 fue medida y normalizada con la absorbancia +- SEM $p < 0.05$. La presencia de dos proteínas virales E (verde) y NS1 (naranja) y la proteína ribosomal RPL18 (rojo) de las células transfectadas e infectadas fue evaluada por microscopía confocal (C). La cantidad de las proteínas virales NS3 y NS5 y la proteína celular RPL18 fue medida mediante ensayos de Western blot (24 hpi) (D). El genoma viral fue cuantificado por qRT-PCR y es expresado +-SEM de eqUFP/ml de tres experimentos independientes * $p < 0.05$.

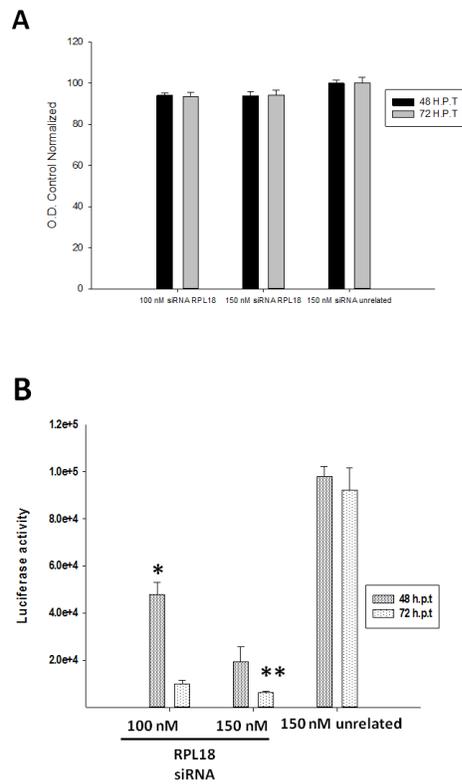


Figura 25. El silenciamiento de la proteína ribosomal RPL18 inhibe la traducción/replicación de DENV. Células Vero que expresan de manera estable el replicón DENV4 fueron transfectadas con diferentes 100 o 150 nM de siRNA RPL18 o con 150 nM de siRNA no relacionado. 48 y 72 hpt el sobrenadante fue utilizado para medir viabilidad (A) las células Vero fueron lisadas para medir la actividad de luciferasa (B). La luciferasa es expresada en unidades relativas de luciferasa (RLU) y los datos son medidos +- SEM de tres experimentos independientes * $p < 0.05$.

VIII. DISCUSIÓN

Los virus son patógenos de gran austeridad genética ya que cuentan con un número limitado de genes, este hecho hace que requieran no solamente proteínas, sino también estructuras y organelos de la célula blanco para ~~lograr~~ completar su ciclo replicativo dentro de ella. Los elementos celulares que requieren constituyen factores de susceptibilidad y/o resistencia, además de que en muchas ocasiones determinan tropismo y especificidad de especie. El conocer los factores celulares que participan en la replicación viral es de gran relevancia, pues desde el primer momento de la infección algunas de las proteínas del primer paso para que el virus infecte a una célula es la unión del virus interaccionanc con su receptor en la superficie de las células blanco por tanto, con su receptor, una de las estrategias para estudiar los factores celulares que participan en el ciclo replicativo viral comprenden el estudio de las moléculas que median la interacción del virus con estructuras y/o componentes celulares. Adicionalmente, se estudian las cascadas de señalización que se encienden en respuesta a la actividad viral. Por otro lado, pPara conocer moléculas que participan en la replicación viral generalmente se han estudiado proteínas unidas tanto que son capaces de unirse al RNA al igual que como a las proteínas virales.

En el caso específico de dengue, éste es capaz de infectar tanto a células de vertebrados como de invertebrados, debido a que se trata de un arbovirus (virus transmitidos por artrópodos) por tanto es posible que DENV requiera de un gran número de factores celulares del huésped ~~tal vez~~ conservados entre ambos organismos. Por ejemplo, De Nova-Ocampo et al en el 2002 mediante ensayos de retardamiento con la región 3' UTR de DENV 4 identificó la interacción con el factor de alargamiento -1α en células de mosquito C6/36. Este factor es conservado para células de mamífero y se ha descrito que interacciona también con la RNT3' del virus del West Nile.

~~En el caso de células de vertebrados se han identificado diferentes componentes y/o estructuras celulares que interaccionan con factores virales.~~ Dentro de las proteínas virales que más han llamado la atención debido a la su importancia tanto en el ciclo de replicación viral como en la patogénesis de la enfermedad son las proteínas no estructurales NS1 y NS5.

Proteína NS5

La proteína no estructural 5 (NS5) posee un tamaño de 105 aminoácidos y un peso molecular de 105 kDa. Es una proteína multifuncional en la región N-terminal posee el dominio S- adenosil metil transferasa y en la C-terminal el dominio de polimerasa dependiente de RNA estas regiones se encuentran separadas por una región interdominio (Rawlinson et al. 2009). La región interdominio de la proteína NS5 reconoce dos secuencias de localización nuclear (SLN): la SLN que es reconocida por importinas α/β y la que es reconocida solo por IMP β 1 (importinas β 1), adicionalmente la región interdominio también tiene secuencias de exporte nuclear (NES) que son reconocidas por la proteína CRM-1 estas secuencia le permiten a la proteína NS5 moverse libremente del citoplasma al núcleo y del núcleo al citoplasma, la función que desempeña en el núcleo aun no es clara.

Dada la importancia que tiene la proteína NS5 en el ciclo replicativo de DENV diferentes grupos de investigadores han utilizado diferentes estrategias metodológicas para aislar e identificar proteínas celulares que interaccionan con NS5. En este trabajo utilizamos la cromatografía de afinidad que nos permitió aislar proteínas celulares del núcleo que interaccionan con NS5 de manera directa e indirecta esta metodología nos permitió aislar las proteínas que interaccionan *in vitro*. Las proteínas aisladas mediante cromatografía de afinidad fueron identificadas por espectrometría de masas con estas condiciones identificamos 36 proteínas celulares que interaccionan con NS5. Seis de las proteínas que nosotros identificamos ya han sido reportadas previamente utilizando otra estrategia experimental como lo es el sistema de doble hibrido donde reportaron la interacción de DDX5, DDX3X y hnRNP con NS5 adicionalmente se han reportado otras proteínas como: HSP90, DDX5 y PRDX6 que son capaces de interaccionar con NS3 (Le Breton et al. 2011; Mairiang et al. 2013; Heaton et al. 2010). La proteína HSP90 también fue identificada en nuestro laboratorio por Reyes-Del Valle (2005) en donde encontró que esta proteína funciona como

receptor en la línea celular monocítica U937. Otra de las proteínas que identificamos es la vimentina esta proteína también encontramos que interacciona con NS1 y ya se ha reportado que interacciona con NS1 y NS4A (Teo y Chu 2014). Otro grupo importante que se ha reportado previamente que tienen participación en el ciclo replicativo viral de dengue son las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRPs), algunas de las que previamente se han descrito para dengue son: hnRNP C1/C2, hnRNP H y hnRNP K (Mishra et al. 2012; Dechtawewat et al. 2015; Brunetti, Scolaro, y Castilla 2015) la actividad general que desempeñan estas proteínas es en la biogénesis del RNA. Un dato interesante es que encontramos a la histona H2B tipo 1 esta proteína ya se ha reportado que es capaz de interactuar con la proteína C en el núcleo de las células a las que infecta (Colpitts et al. 2011) desafortunadamente la función que desempeña la proteína NS5 en el núcleo no se ha descrito. Dentro del grupo de proteínas celulares que nosotros identificamos y que ya han sido caracterizadas previamente para otros virus son: eEF2, DDX5 y DDX3X (Ji et al. 2009; Owsianka y Patel 1999). Un aspecto que nos llamó la atención es que dentro de las proteínas identificadas encontramos dos proteínas sumamente interesantes: DDX5 y hnRNPF debido a la función biológica que desempeñan decidimos analizar el comportamiento de ambas en el ciclo replicativo viral. Previamente se ha reportado que la proteína DDX5 facilita la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) además es un regulador de la replicación del virus de la encefalitis japonesa (VEJ) ya que es capaz de unirse a la región no traducida 3' (Li et al. 2013)

La interacción de las proteínas celulares DDX5 y hnRNPF fueron confirmadas por ensayos de inmunoprecipitación utilizando extractos nucleares tratados con endonucleasa micrococcal, la presencia de las proteínas en los inmunocomplejos no es dependiente del RNA. Al realizar ensayos de microscopía confocal se puede observar la clara y evidente salida de estas proteínas del núcleo hacia el citoplasma específicamente hacia la región perinuclear colocalizando con las proteínas E, NS5 y RNAdc lo cual sugiere que estas proteínas son requeridas por el virus. Como es bien sabido la proteína NS5 posee secuencias tanto de

localización nuclear como de exporte nuclear estas secuencias le permiten a la proteína viral aprovechar la maquinaria de transporte en la célula a la que infecta debido a eso se decidió utilizar un fármaco inhibidor del mecanismo α/β importinas este mecanismo fue descrito que utiliza la proteína viral NS5 para trasladarse al núcleo (Rawlinson et al. 2009) al tratar las células con ivermectina mediante microscopia confocal se puede observar la presencia de la proteína NS5 en el citoplasma celular interesantemente se puede observar a la proteína DDX5 en el núcleo de la célula, lo cual nos sugiere la posible participación de la proteína viral NS5 en el transporte de factores celulares nucleares que se requieren para llevar a cabo el ciclo replicativo de dengue. Para determinar la función específica que desempeñan estas proteínas en el ciclo replicativo de dengue se tendrían que utilizar ensayos específicos utilizando el sistema de replicación y traducción *in vitro*.

Proteína NS1~~La proteína NS5~~

La proteína no estructural 1 (NS1) es una proteína multifuncional, se puede encontrar de tres formas en las células infectadas: de forma monomérica anclada en las regiones membranosas y en el citoplasma, específicamente en la región perinuclear, donde se lleva a cabo el proceso de replicación (B. D. Lindenbach y Rice 1999). De forma dimérica, anclada a la membrana celular y la hexamérica, que es secretada al medio extracelular (Gutsche et al. 2011). La presencia de ésta proteína en suero de pacientes se ha asociado en la patogénesis de la enfermedad (de la Cruz-Hernández et al. 2013), la presencia de esta proteína en el suero de pacientes infectados con el virus pero también proporciona permite hacer un diagnóstico rápido y específico ~~el diagnóstico rápido, ha sido empleado como marcador de la infección por dengue.~~ Además los niveles elevados de esta proteína en el suero correlaciona n con el alto un mayor riesgo que presentan los pacientes en desarrollar fiebre hemorrágica por dengue (de la Cruz-Hernández et al. 2013). Más aún, recientemente se ha descrito que el reconocimiento de NS1 por parte de TLR4 media la fuga plasmática característica de las formas severas del dengue (Beatty et al. 2015; Modhiran et al. 2015).

~~Dado que~~ ~~NS1~~ ~~esta proteína~~ está involucrada tanto en replicación ~~como en la~~ patogénesis ~~haciéndola de gran importancia por ello~~ diferentes grupos han intentado identificar proteínas celulares que interactúan con ~~esta proteína~~, tanto en suero de pacientes como en cultivo celular utilizando diversas estrategias metodológicas. Mediante ensayos ~~de~~ cromatografía de afinidad ~~con la proteína NS1 recombinante y suero humano,~~ seguido por ~~la identificación por~~ espectrometría de masas, se ~~caracterizó~~ ~~identificó~~ a la proteína clusterina (Clu). ~~Esta proteína es capaz de interactuar con la proteína NS1 recombinante~~ La cual es un componente del suero sanguíneo ~~además impide~~ que ~~impide que~~ se lleve a cabo el complejo de ataque a la membrana a través del complemento. ~~Esta interacción sugiriendo que esta interacción~~ pudiera estar involucrada en la pérdida de plasma en la fiebre hemorrágica por dengue (Kurosu et al. 2007). Adicionalmente, también se han descrito otros factores importantes como son la trombina y la protrombina que son capaces de interactuar con NS1 ~~en suero de~~ ~~pacientes.~~ ~~Esta~~ interacción, puede interferir con la coagulación y contribuir a la fiebre hemorrágica por dengue (Lin et al. 2012).

En este trabajo utilizamos dos estrategias diferentes pero complementarias entre sí, ~~que~~ nos permitieron aislar proteínas celulares que interactúan de manera directa o indirecta con las proteínas virales NS1 y NS5. ~~La~~ cromatografía de afinidad nos permitió aislar las proteínas celulares que interactúan *in vitro* ~~con~~ ~~NS1 y NS5,~~ mientras que las inmunoprecipitaciones nos permitió aislar las proteínas celulares que interactúan *in vivo* ~~con ellas.~~ La identificación de estas proteínas se realizó mediante espectrometría de masas. ~~Bajo esas condiciones~~ ~~maldi-Tof utilizando esta estrategia experimental~~ identificamos 64 proteínas celulares que interactúan con la proteína NS1 y 35 que interactúan con ~~NS5~~. Un ~~número importante de~~ ~~a gran cantidad de las~~ proteínas que nosotros reportamos ya habían sido previamente identificadas ~~empleando otras estrategias,~~ ~~interaccionando con alguna proteína viral o con el RNA viral.~~ Por ejemplo, utilizando ~~otras estrategias como~~ el sistema de doble híbrido ~~algunas de las~~ ~~reportaron~~ proteínas ~~comoson~~: eEF1 α , RPL-24, HSP90, VIM, PSMC1 y HNRPF (Le Breton et al. 2011). ~~El~~ eEF1 α también fue identificada en ~~el nuestro~~ laboratorio

por De Nova-Ocampo (2002) en donde encontró que esta proteína era capaz de unirse a la 3'UTR de DENV 4. Sin embargo, la función que desempeña esta proteína es aún desconocida. En nuestro estudio, ~~tAdicionalmente~~ también aislamos e identificamos una serie de proteínas que previamente habían sido reportadas y cuya ~~además~~ la función o participación en la replicación de DENV ya había sido descrita ~~de estas se ha descrito para dengue y para otros virus, una de estas proteínas como ocurre con es~~ la proteína de choque térmico de 90 kDa (HSP90). E ~~esta~~ proteína interactúa con la proteína E y fue aislada mediante cromatografía de afinidad y descrita como el receptor utilizado por DENV en la línea celular monocítica U937 por nuestro grupo (Reyes-Del Valle et al. 2005). Otra de las proteínas que identificamos es ~~fue~~ la vimentina, la cual ~~esta proteína se había reportado~~ previamente que interactuaba con NS1 y NS4A, mediante ensayos de ~~que su~~ silenciamiento observaron una ~~alteración~~ significativa mente ~~en~~ la distribución de los complejos replicativos en las células infectadas por dengue DENV (Teo y Chu 2014), sugiriendo que vimentina es crucial en la organización y localización de los complejos replicativos en la región perinuclear en las células infectadas.

Otra familia de proteínas que previamente se han reportado que tienen alguna participación en el ciclo replicativo de dengue son las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRPs), algunas de las que se han descrito son: hnRP C1/C2, hnRP K Y hnRP H (Kanlaya et al. 2010; Mishra et al. 2012). En general las hnRPs poseen secuencias de unión al RNA, secuencias de localización nuclear y secuencias de interacción proteína-proteína esto lo que les permite participación participar en la biogénesis del RNA. Con, ~~con~~ respecto a C1/C2, las cuales tienen un peso molecular de 41 y 43 kDa respectivamente, se ha descrito que tiene una ~~posible~~ sugiere que tienen interacción con NS1 debido a que por microscopía confocal solo se ha logrado ~~se~~ observar una ~~co-localización~~ parcial de ambas proteínas en la región perinuclear de las células infectadas (Noisakran, Sengsai, et al. 2008). R ~~recientemente~~ se ha descrito que estas proteínas son capaces de interactuar con el RNA mediante ensayos de inmunoprecipitación, reforzando la idea que estas proteínas pudieran tener alguna participación en la replicación del

RNAv (Dechtawewat et al. 2015). Con respecto a la proteína hnRPK se ha descrito que la infección por [dengue-DENV](#) promueve que esta proteína se movilice del núcleo hacia el citoplasma, sugiriendo que pudiera tener participación en el ciclo replicativo [de dengue viral](#) (Brunetti, Scolaro, y Castilla 2015b). ~~A~~ adicionalmente se ha relacionado a la proteína hnRPH con la respuesta antiviral ya que cuando esta proteína es silenciada la producción de TNF- α se ve comprometida (Mishra et al. 2012).

~~Un otro~~ dato que nos llama la atención es la presencia [entre las proteínas identificadas](#) de dos proteínas de núcleo como son las histonas: H2B y H4. ~~E~~ estas proteínas ya se ha reportado que son capaz de interaccionar con la proteína C en el núcleo de las células infectadas (Colpitts et al. 2011). ~~desafortunadamente~~ la función que desempeñan las proteínas virales en el núcleo es desconocida. Dentro de las proteínas celulares que nosotros identificamos y que ya se han caracterizado para otros virus son: RPS25, RPL18A y RPL18 mediante ensayos de silenciamiento se ha demostrado que estas proteínas son importantes para la replicación/traducción del virus de la hepatitis C y el virus del mosaico de la coliflor (Thompson et al. 2009; Dhar et al. 2005).

Un aspecto ~~que nos sorprendió fue el gran número de~~ ~~importante de este trabajo~~ ~~es que encontramos un gran grupo de~~ proteínas ribosomales (aproximadamente el 50% de las 64 proteínas identificadas) [identificadas por su asociación directa o indirecta con NS1](#). ~~pertenecen al ribosoma ya sea de la subunidad mayor o menor~~ Por ello, ~~que~~ decidimos analizar el comportamiento de las proteínas ~~de la subunidad~~ ribosomal ~~mayores de la subunidad mayor~~ RPL18 y RPL18A ~~durante infección~~. ~~A~~ adicionalmente, ~~también~~ se analizó a la proteína metabólica GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) ~~también~~ [identificada en nuestros ensayos](#). ~~Esta proteína, la última proteína se decidió analizar debido a la~~ tiene gran importancia ~~que tiene esta proteína~~ en el metabolismo celular, aunque ~~también~~ ~~previamente~~ se ha reportado que ~~esta proteína~~ modula de manera negativa la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1). ~~Más aún,~~ ~~adicionalmente~~ se ha descrito que ~~esta enzima~~ [GAPDH](#) es capaz de interaccionar

con la región 3' del virus de la encefalitis japonesa (VEJ) (Yang et al. 2009; Kishimoto et al. 2012).

La caracterización ~~que realizamos~~ de estas tres proteínas consistió en evaluar los niveles de expresión mediante ensayos de western blot y su localización mediante ensayos de inmunofluorescencias a diferentes tiempos post-infección. ~~A pesar de que no se observó~~ un cambio significativo en los niveles de expresión sí pudimos observar un cambio en la localización sub-celular ya que estas proteínas se concentraron en la región perinuclear de las células infectadas ~~mientras que en las células no infectadas estas proteínas se pueden observarse encontraban difusas en todo el citoplasma.~~

~~Pudimos confirmar~~ la interacción de estas proteínas ~~fue confirmada con NS1~~ mediante ensayos de co-inmunoprecipitación utilizando extractos totales tratados con endonucleasa micrococcal, ~~sugiriendo que al menos la interacción no depende de la presencia de RNA.~~ Las proteínas ribosomales RPL18 y RPL18A forman parte de la sub-unidad mayor del ribosoma y se ha descrito que estas proteínas tienen funciones extra-ribosomales, por ejemplo, la proteína ribosomal RPL18 participa en la traducción del virus del mosaico de la coliflor, mientras que la proteína ribosomal RPL18A se ha descrito que interacciona con estructuras tipo IRE del VHC (Dhar et al. 2006). Cuando realizamos los ensayos de microscopia confocal pudimos observar la clara re-distribución de la proteína ribosomal RPL18 hacia la región perinuclear sugiriendo que esta es requerida por ~~el virus DENV~~ y pudiera estar participando en algún paso del ciclo replicativo, por ello se decidió evaluar ~~la participación de ésta proteína en la infección. Para ello, RPL18 aspectos importantes del comportamiento del virus cuando está proteína fue~~ silenciada mediante siRNA específicos dirigidos contra la proteína ~~y una vez silenciada, los aspectos que evaluamos el efecto del silenciamiento en fueron:~~ rendimiento viral, ~~mediante ensayos de plaqueo,~~ expresión de proteínas virales y síntesis de RNAv. ~~Así, El efecto del silenciamiento fue confirmado al medir la actividad de luciferasa en células vero establemente transfectadas con el replicón de dengue virus 4 (Vero-R4) la proteína es importante en la traducción/replicación del virus ya que~~

observamos una disminución del rendimiento viral, ~~disminución-reducción~~ en la cantidad de proteínas virales y ~~de disminución en la cantidad de-RNAv en las células en donde RPL-18 fue silenciada con respecto a las que fueron con un siRNA no relacionado.~~ Este efecto no se debió a una reducción generalizada de la síntesis de proteínas celulares como confirmamos mediante marcaje con Metionina-³⁵S. ~~A-adicionalmente,~~ también observamos una disminución en la actividad de luciferasa, en células Vero establemente transfectadas con el replicón de dengue virus 4 (Vero R4) que codifica para luciferasa confirmando que RPL18 es importante en la traducción/replicación del virus.

Con formato: Superíndice

~~estos datos sugieren la participación de esta proteína en la infección.~~ Una de las posibilidades para explicar estos resultados es que la proteína NS1 sea una proteína de andamiaje para que se unan proteínas celulares que son importantes en la traducción/replicación viral. ~~Se sabe que,~~ además NS1 ~~posee dominios transmembranales lo cual implica que esta proteína~~ se encuentra en el lumen del retículo endoplásmico lo cual ~~implica que podría permitir su interacción~~ ~~la proteína viral se encuentra interaccionando~~ con las proteínas ribosomales. Otra posibilidad es que NS1 en su forma nativa interaccionara con proteínas ribosomales durante el proceso de doblamiento y paso a través del translocón durante la síntesis de proteínas virales. Dado que todas las proteínas de DENV requieren ser traducidas en el RE, debido a su estrecho contacto con el, es posible que la síntesis y maduración de las proteínas virales dependa de un grupo de proteínas ribosomales, entre ellas RPL18. Sin embargo, para determinar la de participación manera específica la participación de la proteína ribosomal RPL18 en el ciclo replicativo de dengue y poder dilucidar si participa en la traducción, replicación o en ambas se tendrían que realizar ensayos específicos como en sistemas de replicación y traducción *in vitro*, así como ensayos de retardo con esto podremos determinar la actividad funcional de esta proteína celular en la infección por dengue.

IX. CONCLUSIONES

- a) Dengue requiere de factores, estructuras y proteínas celulares para llevar a cabo el ciclo replicativo de manera eficiente.
- b) Las proteínas nucleares DDX5 y hnRNPF cambian su localización en las células Huh-7 infectadas con dengue, esta proteína sale del núcleo al citoplasma específicamente en la región perinuclear.
- c) La proteína RPL-18 se redistribuye a la región perinuclear en las células infectadas.
- d) El silenciamiento de la proteína RPL18 no afecta el metabolismo ni la viabilidad celular pero sí compromete el rendimiento viral.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Zhang, Ying, Wei Zhang, Steven Ogata, David Clements, James H. Strauss, Timothy S. Baker, Richard J. Kuhn, and Michael G. Rossmann. "Conformational Changes of the Flavivirus E

- Glycoprotein." *Structure* 12, no. 9 (September 2004): 1607–18. doi:10.1016/j.str.2004.06.019.
- Zhang, Ying, Jeroen Corver, Paul R. Chipman, Wei Zhang, Sergei V. Pletnev, Dagmar Sedlak, Timothy S. Baker, James H. Strauss, Richard J. Kuhn, and Michael G. Rossmann. "Structures of Immature Flavivirus Particles." *The EMBO Journal* 22, no. 11 (June 1, 2003): 2604–13. doi:10.1093/emboj/cdg270.
- Yocupicio-Monroy, Rosa Martha E., Fernando Medina, Jorge Reyes-del Valle, and Rosa M. del Angel. "Cellular Proteins from Human Monocytes Bind to Dengue 4 Virus Minus-Strand 3' Untranslated Region RNA." *Journal of Virology* 77, no. 5 (March 1, 2003): 3067–76. doi:10.1128/JVI.77.5.3067-3076.2003.
- Yocupicio-Monroy, Martha, R. Padmanabhan, Fernando Medina, and Rosa M. del Angel. "Mosquito La Protein Binds to the 3' Untranslated Region of the Positive and Negative Polarity Dengue Virus RNAs and Relocates to the Cytoplasm of Infected Cells." *Virology* 357, no. 1 (Enero 2007): 29–40. doi:10.1016/j.virol.2006.07.042.
- Ye, Jin. "Reliance of Host Cholesterol Metabolic Pathways for the Life Cycle of Hepatitis C Virus." *PLoS Pathog* 3, no. 8 (Agosto 2007): e108. doi:10.1371/journal.ppat.0030108.
- Yang, Shaomei, and Lin Jia. "Research on Urban Public Traffic Satisfaction Evaluation Model Based on BP Neural Network Algorithm." In *Second International Workshop on Knowledge Discovery and Data Mining, 2009. WKDD 2009*, 40–43, 2009. doi:10.1109/WKDD.2009.61.
- Yang, Shang-Hua, Mei-Lan Liu, Chih-Feng Tien, Shih-Jie Chou, and Ruey-Yi Chang. "Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Interaction with 3' Ends of Japanese Encephalitis Virus RNA and Colocalization with the Viral NS5 Protein." *Journal of Biomedical Science* 16 (2009): 40. doi:10.1186/1423-0127-16-40.
- Yamasaki, Satoshi, Georg Stoecklin, Nancy Kedersha, Maria Simarro, and Paul Anderson. "T-Cell Intracellular Antigen-1 (TIA-1)-Induced Translational Silencing Promotes the Decay of Selected mRNAs." *Journal of Biological Chemistry* 282, no. 41 (October 12, 2007): 30070–77. doi:10.1074/jbc.M706273200.
- Winkler, G., V. B. Randolph, G. R. Cleaves, T. E. Ryan, and V. Stollar. "Evidence That the Mature Form of the Flavivirus Nonstructural Protein NS1 Is a Dimer." *Virology* 162, no. 1 (January 1988): 187–96.
- Wati, S., M.-L. Soo, P. Zilm, P. Li, A. W. Paton, C. J. Burrell, M. Beard, and J. M. Carr. "Dengue Virus Infection Induces Upregulation of GRP78, Which Acts to Chaperone Viral Antigen Production." *Journal of Virology* 83, no. 24 (December 2009): 12871–80. doi:10.1128/JVI.01419-09.
- Wang, Jia-Li, Jun-Lei Zhang, Wei Chen, Xiao-Feng Xu, Na Gao, Dong-Ying Fan, and Jing An. "Roles of Small GTPase Rac1 in the Regulation of Actin Cytoskeleton during Dengue Virus Infection." *PLoS Negl Trop Dis* 4, no. 8 (Agosto 2010): e809. doi:10.1371/journal.pntd.0000809.
- Wagstaff, Kylie M., Haran Sivakumaran, Steven M. Heaton, David Harrich, and David A. Jans. "Ivermectin Is a Specific Inhibitor of Importin α/β -Mediated Nuclear Import Able to Inhibit Replication of HIV-1 and Dengue Virus." *Biochemical Journal* 443, no. 3 (May 1, 2012): 851–56. doi:10.1042/BJ20120150.
- Villordo, Sergio M., and Andrea V. Gamarnik. "Genome Cyclization as Strategy for Flavivirus RNA Replication." *Virus Research*, Structural motifs controlling the replication cycle of positive strand RNA viruses, 139, no. 2 (February 2009): 230–39. doi:10.1016/j.virusres.2008.07.016.
- Vega-Almeida, Tania Olivia, Mariana Salas-Benito, Mónica Ascensión De Nova-Ocampo, Rosa María Del Angel, and Juan Santiago Salas-Benito. "Surface Proteins of C6/36 Cells Involved in Dengue Virus 4 Binding and Entry." *Archives of Virology* 158, no. 6 (June 2013): 1189–1207. doi:10.1007/s00705-012-1596-0.

- Theparit, Chutima, and Duncan R. Smith. "Serotype-Specific Entry of Dengue Virus into Liver Cells: Identification of the 37-kilodalton/67-Kilodalton High-Affinity Laminin Receptor as a Dengue Virus Serotype 1 Receptor." *Journal of Virology* 78, no. 22 (November 2004): 12647–56. doi:10.1128/JVI.78.22.12647-12656.2004.
- Teo, Catherine Su Hui, and Justin Jang Hann Chu. "Cellular Vimentin Regulates Construction of Dengue Virus Replication Complexes through Interaction with NS4A Protein." *Journal of Virology* 88, no. 4 (February 2014): 1897–1913. doi:10.1128/JVI.01249-13.
- Tassaneetrithep, Boonrat, Timothy H. Burgess, Angela Granelli-Piperno, Christine Trumpfheller, Jennifer Finke, Wellington Sun, Michael A. Eller, et al. "DC-SIGN (CD209) Mediates Dengue Virus Infection of Human Dendritic Cells." *The Journal of Experimental Medicine* 197, no. 7 (April 7, 2003): 823–29. doi:10.1084/jem.20021840.
- Tay, M. Y. F., J. E. Fraser, W. K. K. Chan, N. J. Moreland, A. P. Rathore, C. Wang, S. G. Vasudevan, and D. A. Jans. "Nuclear Localization of Dengue Virus (DENV) 1–4 Non-Structural Protein 5; Protection against All 4 DENV Serotypes by the Inhibitor Ivermectin." *Antiviral Research* 99, no. 3 (September 2013): 301–6. doi:10.1016/j.antiviral.2013.06.002.
- Tajima, Shigeru, Tomohiko Takasaki, and Ichiro Kurane. "Characterization of Asn130-to-Ala Mutant of Dengue Type 1 Virus NS1 Protein." *Virus Genes* 36, no. 2 (April 2008): 323–29. doi:10.1007/s11262-008-0211-7.
- Upadya, Megha Haridas, Jude Juventus Aweya, and Yee-Joo Tan. "Understanding the Interaction of Hepatitis C Virus with Host DEAD-Box RNA Helicases." *World Journal of Gastroenterology: WJG* 20, no. 11 (March 21, 2014): 2913–26. doi:10.3748/wjg.v20.i11.2913.
- Syed, Gulam H, Yutaka Amako, and Aleem Siddiqui. "Hepatitis C Virus Hijacks Host Lipid Metabolism." *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 21, no. 1 (January 2010): 33. doi:10.1016/j.tem.2009.07.005.
- Stiasny, Karin, and Franz X. Heinz. "Flavivirus Membrane Fusion." *The Journal of General Virology* 87, no. Pt 10 (October 2006): 2755–66. doi:10.1099/vir.0.82210-0.
- Srikiatkhachorn, Anon. "Plasma Leakage in Dengue Haemorrhagic Fever." *Thromb Haemost* 102, no. 6 (2009): 1042–49. doi:10.1160/TH09-03-0208.
- Soto-Acosta, Rubén, Clemente Mosso, Margot Cervantes-Salazar, Henry Puerta-Guardo, Fernando Medina, Liliانا Favari, Juan E. Ludert, and Rosa María del Angel. "The Increase in Cholesterol Levels at Early Stages after Dengue Virus Infection Correlates with an Augment in LDL Particle Uptake and HMG-CoA Reductase Activity." *Virology* 442, no. 2 (August 1, 2013): 132–47. doi:10.1016/j.virol.2013.04.003.
- Smith, G. W., and P. J. Wright. "Synthesis of Proteins and Glycoproteins in Dengue Type 2 Virus-Infected Vero and Aedes Albopictus Cells." *The Journal of General Virology* 66 (Pt 3) (March 1985): 559–71.
- Silva, Emiliana M., Jonas N. Conde, Diego Allonso, Mauricio L. Nogueira, and Ronaldo Mohana-Borges. "Mapping the Interactions of Dengue Virus NS1 Protein with Human Liver Proteins Using a Yeast Two-Hybrid System: Identification of C1q as an Interacting Partner." *PLoS One* 8, no. 3 (2013): e57514. doi:10.1371/journal.pone.0057514.
- Samsa, Marcelo M., Juan A. Mondotte, Nestor G. Iglesias, Iranaia Assunção-Miranda, Giselle Barbosa-Lima, Andrea T. Da Poian, Patricia T. Bozza, and Andrea V. Gamarnik. "Dengue Virus Capsid Protein Usurps Lipid Droplets for Viral Particle Formation." *PLoS Pathogens* 5, no. 10 (October 2009): e1000632. doi:10.1371/journal.ppat.1000632.
- Sakoonwatanyoo, Prirayapak, Verawan Boonsanay, and Duncan R. Smith. "Growth and Production of the Dengue Virus in C6/36 Cells and Identification of a Laminin-Binding Protein as a Candidate Serotype 3 and 4 Receptor Protein." *Intervirology* 49, no. 3 (2006): 161–72. doi:10.1159/000089377.

- Perera, Rushika, and Richard J Kuhn. "Structural Proteomics of Dengue Virus." *Current Opinion in Microbiology*, Host-microbe interactions: fungi/parasites/viruses, 11, no. 4 (Agosto 2008): 369-77. doi:10.1016/j.mib.2008.06.004.
- Rozen-Gagnon, Kathryn, Nicole J. Moreland, Christiane Ruedl, and Subhash G. Vasudevan. "Expression and Immunoaffinity Purification of Recombinant Dengue Virus 2 NS1 Protein as a Cleavable SUMOstar Fusion." *Protein Expression and Purification* 82, no. 1 (March 2012): 20-25. doi:10.1016/j.pep.2011.11.003.
- Rothwell, Christopher, Aude Lebreton, Chuan Young Ng, Joanne Y. H. Lim, Wei Liu, Subhash Vasudevan, Mark Labow, Feng Gu, and L. Alex Gaither. "Cholesterol Biosynthesis Modulation Regulates Dengue Viral Replication." *Virology* 389, no. 1-2 (June 20, 2009): 8-19. doi:10.1016/j.virol.2009.03.025.
- Rodenhuis-Zybert, Izabela A., Jan Wilschut, and Jolanda M. Smit. "Dengue Virus Life Cycle: Viral and Host Factors Modulating Infectivity." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 67, no. 16 (August 2010): 2773-86. doi:10.1007/s00018-010-0357-z.
- Rice, C. M., E. M. Lenches, S. R. Eddy, S. J. Shin, R. L. Sheets, and J. H. Strauss. "Nucleotide Sequence of Yellow Fever Virus: Implications for Flavivirus Gene Expression and Evolution." *Science (New York, N.Y.)* 229, no. 4715 (August 23, 1985): 726-33.
- Reyes-Del Valle, Jorge, Salvador Chávez-Salinas, Fernando Medina, and Rosa M. Del Angel. "Heat Shock Protein 90 and Heat Shock Protein 70 Are Components of Dengue Virus Receptor Complex in Human Cells." *Journal of Virology* 79, no. 8 (April 2005): 4557-67. doi:10.1128/JVI.79.8.4557-4567.2005.
- Rawlinson, Stephen M., Melinda J. Pryor, Peter J. Wright, and David A. Jans. "CRM1-Mediated Nuclear Export of Dengue Virus RNA Polymerase NS5 Modulates Interleukin-8 Induction and Virus Production." *The Journal of Biological Chemistry* 284, no. 23 (June 5, 2009): 15589-97. doi:10.1074/jbc.M808271200.
- Pryor, M. J., and P. J. Wright. "Glycosylation Mutants of Dengue Virus NS1 Protein." *The Journal of General Virology* 75 (Pt 5) (May 1994): 1183-87. doi:10.1099/0022-1317-75-5-1183.
- Pounsawai, Jesdaporn, Rattiyaporn Kanlaya, Sa-nga Pattanakitsakul, and Visith Thongboonkerd. "Subcellular Localizations and Time-Course Expression of Dengue Envelope and Non-Structural 1 Proteins in Human Endothelial Cells." *Microbial Pathogenesis* 51, no. 3 (September 2011): 225-29. doi:10.1016/j.micpath.2011.04.011.
- Poh, Mee Kian, Guanghou Shui, Xuping Xie, Pei-Yong Shi, Markus R. Wenk, and Feng Gu. "U18666A, an Intra-Cellular Cholesterol Transport Inhibitor, Inhibits Dengue Virus Entry and Replication." *Antiviral Research* 93, no. 1 (January 2012): 191-98. doi:10.1016/j.antiviral.2011.11.014.
- Poch, O, I Sauvaget, M Delarue, and N Tordo. "Identification of Four Conserved Motifs among the RNA-Dependent Polymerase Encoding Elements." *The EMBO Journal* 8, no. 12 (December 1, 1989): 3867-74.
- Pattanakitsakul, Sa-nga, Jesdaporn Pounsawai, Rattiyaporn Kanlaya, Supachok Sinchaikul, Shui-Tein Chen, and Visith Thongboonkerd. "Association of Alix with Late Endosomal Lysobisphosphatidic Acid Is Important for Dengue Virus Infection in Human Endothelial Cells." *Journal of Proteome Research* 9, no. 9 (September 3, 2010): 4640-48. doi:10.1021/pr100357f.
- Noisakran, Sansanee, Suchada Sengsai, Visith Thongboonkerd, Rattiyaporn Kanlaya, Supachok Sinchaikul, Shui-Tein Chen, Chunya Puttikhunt, et al. "Identification of Human hnRNP C1/C2 as a Dengue Virus NS1-Interacting Protein." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 372, no. 1 (July 18, 2008): 67-72. doi:10.1016/j.bbrc.2008.04.165.
- Noisakran, Sansanee, Thanyaporn Dechtawewat, Panisadee Avirutnan, Taroh Kinoshita, Uamporn Siripanyaphinyo, Chunya Puttikhunt, Watchara Kasinrer, Prida Malasit, and

- Nopporn Sittisombut. "Association of Dengue Virus NS1 Protein with Lipid Rafts." *The Journal of General Virology* 89, no. Pt 10 (October 2008): 2492–2500. doi:10.1099/vir.0.83620-0.
- Nishiyama, Takashi, Hiroshi Yamamoto, Toshio Uchiumi, and Nobuhiko Nakashima. "Eukaryotic Ribosomal Protein RPS25 Interacts with the Conserved Loop Region in a Dicitroviral Intergenic Internal Ribosome Entry Site." *Nucleic Acids Research* 35, no. 5 (2007): 1514–21. doi:10.1093/nar/gkl1121.
- Navarro-Sánchez, Erika, Philippe Desprès, and Leticia Cedillo-Barrón. "Innate Immune Responses to Dengue Virus." *Archives of Medical Research* 36, no. 5 (October 2005): 425–35. doi:10.1016/j.arcmed.2005.04.007.
- Navarro-Sanchez, Erika, Ralf Altmeyer, Ali Amara, Olivier Schwartz, Franck Fieschi, Jean-Louis Virelizier, Fernando Arenzana-Seisdedos, and Philippe Desprès. "Dendritic-Cell-Specific ICAM3-Grabbing Non-Integrin Is Essential for the Productive Infection of Human Dendritic Cells by Mosquito-Cell-Derived Dengue Viruses." *EMBO Reports* 4, no. 7 (July 2003): 723–28. doi:10.1038/sj.embor.embor866.
- Nag, Dilip K., and Daniel Finley. "A Small-Molecule Inhibitor of Deubiquitinating Enzyme USP14 Inhibits Dengue Virus Replication." *Virus Research* 165, no. 1 (April 2012): 103–6. doi:10.1016/j.virusres.2012.01.009.
- Mosso, Clemente, Ivan J. Galván-Mendoza, Juan Ernesto Ludert, and Rosa M. del Angel. "Endocytic Pathway Followed by Dengue Virus to Infect the Mosquito Cell Line C6/36 HT." *Virology* 378, no. 1 (August 15, 2008): 193–99. doi:10.1016/j.virol.2008.05.012.
- Morrison, Juliet, and Adolfo García-Sastre. "STAT2 Signaling and Dengue Virus Infection." *JAK-STAT* 3, no. 1 (January 1, 2014): e27715. doi:10.4161/jkst.27715.
- Mishra, K. P., null Shweta, Drishya Diwaker, and Lilly Ganju. "Dengue Virus Infection Induces Upregulation of Hn RNP-H and PDIA3 for Its Multiplication in the Host Cell." *Virus Research* 163, no. 2 (February 2012): 573–79. doi:10.1016/j.virusres.2011.12.010.
- Martina, Byron E. E., Penelope Koraka, and Albert D. M. E. Osterhaus. "Dengue Virus Pathogenesis: An Integrated View." *Clinical Microbiology Reviews* 22, no. 4 (October 2009): 564–81. doi:10.1128/CMR.00035-09.
- Malet, Hélène, Nicolas Massé, Barbara Selisko, Jean-Louis Romette, Karine Alvarez, Jean Claude Guillemot, Hughes Tolou, et al. "The Flavivirus Polymerase as a Target for Drug Discovery." *Antiviral Research* 80, no. 1 (October 2008): 23–35. doi:10.1016/j.antiviral.2008.06.007.
- Mairiang, Dumrong, Huamei Zhang, Ann Sodja, Thilakam Murali, Prapat Suriyaphol, Prida Malasit, Thawornchai Limjindaporn, and Russell L. Finley. "Identification of New Protein Interactions between Dengue Fever Virus and Its Hosts, Human and Mosquito." *PloS One* 8, no. 1 (2013): e53535. doi:10.1371/journal.pone.0053535.
- Mackow, E., Y. Makino, B. T. Zhao, Y. M. Zhang, L. Markoff, A. Buckler-White, M. Guiler, R. Chanock, and C. J. Lai. "The Nucleotide Sequence of Dengue Type 4 Virus: Analysis of Genes Coding for Nonstructural Proteins." *Virology* 159, no. 2 (August 1987): 217–28.
- Mackenzie, J. M., M. K. Jones, and P. R. Young. "Immunolocalization of the Dengue Virus Nonstructural Glycoprotein NS1 Suggests a Role in Viral RNA Replication." *Virology* 220, no. 1 (June 1, 1996): 232–40. doi:10.1006/viro.1996.0307.
- Krishnan, Manoj N., Bindu Sukumaran, Utpal Pal, Herve Agaisse, James L. Murray, Thomas W. Hodge, and Erol Fikrig. "Rab 5 Is Required for the Cellular Entry of Dengue and West Nile Viruses." *Journal of Virology* 81, no. 9 (May 2007): 4881. doi:10.1128/JVI.02210-06.
- Ludert, Juan E., Clemente Mosso, Ivonne Ceballos-Olvera, and Rosa M. del Angel. "Use of a Commercial Enzyme Immunoassay to Monitor Dengue Virus Replication in Cultured Cells." *Virology Journal* 5 (2008): 51. doi:10.1186/1743-422X-5-51.
- Lindenbach, Brett D., and Charles M. Rice. "Molecular Biology of Flaviviruses." *Advances in Virus Research* 59 (2003): 23–61.

- Lindenbach, B. D., and C. M. Rice. "Genetic Interaction of Flavivirus Nonstructural Proteins NS1 and NS4A as a Determinant of Replicase Function." *Journal of Virology* 73, no. 6 (June 1999): 4611–21.
- Lindenbach, B. D., and C. M. Rice. "Trans-Complementation of Yellow Fever Virus NS1 Reveals a Role in Early RNA Replication." *Journal of Virology* 71, no. 12 (December 1997): 9608–17.
- Lin, Shi-Wei, Yung-Chun Chuang, Yee-Shin Lin, Huan-Yao Lei, Hsiao-Sheng Liu, and Trai-Ming Yeh. "Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Binds to Prothrombin/thrombin and Inhibits Prothrombin Activation." *The Journal of Infection* 64, no. 3 (March 2012): 325–34. doi:10.1016/j.jinf.2011.11.023.
- Limjindaporn, Thawornchai, Wiyada Wongwiwat, Sansanee Noisakran, Chatchawan Srisawat, Janjuree Netsawang, Chunya Puttikhunt, Watchara Kasinrerak, et al. "Interaction of Dengue Virus Envelope Protein with Endoplasmic Reticulum-Resident Chaperones Facilitates Dengue Virus Production." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379, no. 2 (February 6, 2009): 196–200. doi:10.1016/j.bbrc.2008.12.070.
- Le Sommer, Caroline, Nicholas J. Barrows, Shelton S. Bradrick, James L. Pearson, and Mariano A. Garcia-Blanco. "G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 Promotes Flaviviridae Entry and Replication." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6, no. 9 (2012): e1820. doi:10.1371/journal.pntd.0001820.
- Leh, V., P. Yot, and M. Keller. "The Cauliflower Mosaic Virus Translational Transactivator Interacts with the 60S Ribosomal Subunit Protein L18 of Arabidopsis Thaliana." *Virology* 266, no. 1 (January 5, 2000): 1–7. doi:10.1006/viro.1999.0073.
- Lee, Amy Si-Ying, Rebeca Burdeinick-Kerr, and Sean P. J. Whelan. "A Ribosome-Specialized Translation Initiation Pathway Is Required for Cap-Dependent Translation of Vesicular Stomatitis Virus mRNAs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, no. 1 (January 2, 2013): 324–29. doi:10.1073/pnas.1216454109.
- Le Breton, Marc, Laurene Meyniel-Schicklin, Alexandre Deloire, Bruno Coutard, Bruno Canard, Xavier de Lamballerie, Patrice Andre, Chantal Rabourdin-Combe, Vincent Lotteau, and Nathalie Davoust. "Flavivirus NS3 and NS5 Proteins Interaction Network: A High-Throughput Yeast Two-Hybrid Screen." *BMC Microbiology* 11 (2011): 234. doi:10.1186/1471-2180-11-234.
- Kurosu, Takeshi, Panjaporn Chaichana, Masanobu Yamate, Surapee Anantapreecha, and Kazuyoshi Ikuta. "Secreted Complement Regulatory Protein Clusterin Interacts with Dengue Virus Nonstructural Protein 1." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362, no. 4 (November 3, 2007): 1051–56. doi:10.1016/j.bbrc.2007.08.137.
- Krishnan, Manoj N., Bindu Sukumaran, Utpal Pal, Herve Agaisse, James L. Murray, Thomas W. Hodge, and Erol Fikrig. "Rab 5 Is Required for the Cellular Entry of Dengue and West Nile Viruses." *Journal of Virology* 81, no. 9 (May 2007): 4881–85. doi:10.1128/JVI.02210-06.
- Koonin, E. V. "Computer-Assisted Identification of a Putative Methyltransferase Domain in NS5 Protein of Flaviviruses and Lambda 2 Protein of Reovirus." *The Journal of General Virology* 74 (Pt 4) (April 1993): 733–40.
- Kishimoto, Naoki, Ayano Onitsuka, Keishi Kido, Nobutoki Takamune, Shozo Shoji, and Shogo Misumi. "Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase Negatively Regulates Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection." *Retrovirology* 9 (2012): 107. doi:10.1186/1742-4690-9-107.
- Kanlaya, Rattiyaporn, Sa-nga Pattanakitsakul, Supachok Sinchaikul, Shui-Tein Chen, and Visith Thongboonkerd. "Vimentin Interacts with Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins and Dengue Nonstructural Protein 1 and Is Important for Viral Replication and Release." *Molecular bioSystems* 6, no. 5 (May 2010): 795–806. doi:10.1039/b923864f.

- Johnson, Barbara W., Brandy J. Russell, and Robert S. Lanciotti. "Serotype-Specific Detection of Dengue Viruses in a Fourplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay." *Journal of Clinical Microbiology* 43, no. 10 (October 2005): 4977–83. doi:10.1128/JCM.43.10.4977-4983.2005.
- Jindadamrongwech, S., C. Thepparit, and D. R. Smith. "Identification of GRP 78 (BiP) as a Liver Cell Expressed Receptor Element for Dengue Virus Serotype 2." *Archives of Virology* 149, no. 5 (May 2004): 915–27. doi:10.1007/s00705-003-0263-x.
- Jagannathan, Sujatha, Jack C.-C. Hsu, David W. Reid, Qiang Chen, Will J. Thompson, Arthur M. Moseley, and Christopher V. Nicchitta. "Multifunctional Roles for the Protein Translocation Machinery in RNA Anchoring to the Endoplasmic Reticulum." *The Journal of Biological Chemistry* 289, no. 37 (September 12, 2014): 25907–24. doi:10.1074/jbc.M114.580688.
- Henchal, E. A., L. S. Henchal, and J. J. Schlesinger. "Synergistic Interactions of Anti-NS1 Monoclonal Antibodies Protect Passively Immunized Mice from Lethal Challenge with Dengue 2 Virus." *The Journal of General Virology* 69 (Pt 8) (August 1988): 2101–7.
- Heinz, F. X., K. Stiasny, and S. L. Allison. "The Entry Machinery of Flaviviruses." *Archives of Virology. Supplementum*, no. 18 (2004): 133–37.
- Heaton, Nicholas S., Rushika Perera, Kristi L. Berger, Sudip Khadka, Douglas J. Lacount, Richard J. Kuhn, and Glenn Randall. "Dengue Virus Nonstructural Protein 3 Redistributes Fatty Acid Synthase to Sites of Viral Replication and Increases Cellular Fatty Acid Synthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, no. 40 (October 5, 2010): 17345–50. doi:10.1073/pnas.1010811107.
- Gutsche, Irina, Fasséli Coulibaly, James E. Voss, Jérôme Salmon, Jacques d'Alayer, Myriam Ermonval, Eric Larquet, et al. "Secreted Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Is an Atypical Barrel-Shaped High-Density Lipoprotein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, no. 19 (May 10, 2011): 8003–8. doi:10.1073/pnas.1017338108.
- Guo, Xiang, Yao Xu, Guowu Bian, Andrew D. Pike, Yan Xie, and Zhiyong Xi. "Response of the Mosquito Protein Interaction Network to Dengue Infection." *BMC Genomics* 11 (2010): 380. doi:10.1186/1471-2164-11-380.
- Gubler, D. J., and M. Meltzer. "Impact of Dengue/dengue Hemorrhagic Fever on the Developing World." *Advances in Virus Research* 53 (1999): 35–70.
- Gebhard, Leopoldo G., Claudia V. Filomatori, and Andrea V. Gamarnik. "Functional RNA Elements in the Dengue Virus Genome." *Viruses* 3, no. 9 (September 2011): 1739–56. doi:10.3390/v3091739.
- García-Montalvo, Beatriz María, Fernando Medina, and Rosa M. del Angel. "La Protein Binds to NS5 and NS3 and to the 5' and 3' Ends of Dengue 4 Virus RNA." *Virus Research* 102, no. 2 (June 15, 2004): 141–50. doi:10.1016/j.virusres.2004.01.024.
- Fraser, Johanna E., Stephen M. Rawlinson, Chunxiao Wang, David A. Jans, and Kylie M. Wagstaff. "Investigating Dengue Virus Nonstructural Protein 5 (NS5) Nuclear Import." In *Dengue*, edited by Radhakrishnan Padmanabhan and Subhash G. Vasudevan, 301–28. *Methods in Molecular Biology* 1138. Springer New York, 2014. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-0348-1_19.
- Falgout, B., M. Bray, J. J. Schlesinger, and C. J. Lai. "Immunization of Mice with Recombinant Vaccinia Virus Expressing Authentic Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Protects against Lethal Dengue Virus Encephalitis." *Journal of Virology* 64, no. 9 (September 1990): 4356–63.
- Egloff, Marie-Pierre, Etienne Decroly, H el ene Malet, Barbara Selisko, Delphine Benarroch, François Ferron, and Bruno Canard. "Structural and Functional Analysis of Methylation and 5'-RNA Sequence Requirements of Short Capped RNAs by the Methyltransferase

- Domain of Dengue Virus NS5." *Journal of Molecular Biology* 372, no. 3 (September 21, 2007): 723–36. doi:10.1016/j.jmb.2007.07.005.
- Duan, Xiaqun, Xi Lu, Jun Li, and Yongming Liu. "Novel Binding between Pre-Membrane Protein and Vacuolar ATPase Is Required for Efficient Dengue Virus Secretion." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 373, no. 2 (Agosto 2008): 319–24. doi:10.1016/j.bbrc.2008.06.041.
- Dhar, D., K. Mapa, R. Pudi, P. Srinivasan, K. Bodhinathan, and S. Das. "Human Ribosomal Protein L18a Interacts with Hepatitis C Virus Internal Ribosome Entry Site." *Archives of Virology* 151, no. 3 (March 2006): 509–24. doi:10.1007/s00705-005-0642-6.
- Deubel, V., R. M. Kinney, and D. W. Trent. "Nucleotide Sequence and Deduced Amino Acid Sequence of the Nonstructural Proteins of Dengue Type 2 Virus, Jamaica Genotype: Comparative Analysis of the Full-Length Genome." *Virology* 165, no. 1 (July 1988): 234–44.
- De Nova-Ocampo, Mónica, Nicolás Villegas-Sepúlveda, and Rosa M. del Angel. "Translation Elongation Factor-1alpha, La, and PTB Interact with the 3' Untranslated Region of Dengue 4 Virus RNA." *Virology* 295, no. 2 (April 10, 2002): 337–47. doi:10.1006/viro.2002.1407.
- de la Cruz-Hernández, Sergio I., Hilario Flores-Aguilar, Silvia González-Mateos, Irma López-Martínez, Celia Alpuche-Aranda, Juan E. Ludert, and Rosa M. del Angel. "Determination of Viremia and Concentration of Circulating Nonstructural Protein 1 in Patients Infected with Dengue Virus in Mexico." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 88, no. 3 (March 2013): 446–54. doi:10.4269/ajtmh.12-0023.
- Dechtawewat, Thanyaporn, Pucharee Songprakhon, Thawornchai Limjindaporn, Chunya Puttikhunt, Watchara Kasinrerak, Sawanan Saitornuang, Pa-thai Yenchitsomanus, and Sansanee Noisakran. "Role of Human Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C1/C2 in Dengue Virus Replication." *Virology Journal* 12 (February 6, 2015). doi:10.1186/s12985-014-0219-7.
- Colpitts, Tonya M., Sebastian Barthel, Penghua Wang, and Erol Fikrig. "Dengue Virus Capsid Protein Binds Core Histones and Inhibits Nucleosome Formation in Human Liver Cells." *PLoS One* 6, no. 9 (2011): e24365. doi:10.1371/journal.pone.0024365.
- Chua, John Jia-En, Raghavan Bhuvanankantham, Vincent Tak-Kwong Chow, and Mah-Lee Ng. "Recombinant Non-Structural 1 (NS1) Protein of Dengue-2 Virus Interacts with Human STAT3beta Protein." *Virus Research* 112, no. 1–2 (September 2005): 85–94. doi:10.1016/j.virusres.2005.03.025.
- Chou, Chang-Wei, Lin-Ru Tai, Ralph Kirby, I.-Fang Lee, and Alan Lin. "Importin β Mediates the Nuclear Import of Human Ribosomal Protein L7 through Its Interaction with the Multifaceted Basic Clusters of L7." *FEBS Letters* 584, no. 19 (October 8, 2010): 4151–56. doi:10.1016/j.febslet.2010.08.044.
- Chokephaibulkit, Kulkanya, and Guey Chuen Perng. "Challenges for the Formulation of a Universal Vaccine against Dengue." *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 238, no. 5 (May 2013): 566–78. doi:10.1177/1535370212473703.
- Chien, Li-Jung, Tsai-Ling Liao, Pei-Yun Shu, Jyh-Hsiung Huang, Duane J. Gubler, and Gwong-Jen J. Chang. "Development of Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays to Detect and Serotype Dengue Viruses." *Journal of Clinical Microbiology* 44, no. 4 (April 2006): 1295–1304. doi:10.1128/JCM.44.4.1295-1304.2006.
- Cheng, Hsien-Jen, Huan-Yao Lei, Chiou-Feng Lin, Yueh-Hsia Luo, Shu-Wen Wan, Hsiao-Sheng Liu, Trai-Ming Yeh, and Yee-Shin Lin. "Anti-Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Antibodies Recognize Protein Disulfide Isomerase on Platelets and Inhibit Platelet Aggregation." *Molecular Immunology* 47, no. 2–3 (December 2009): 398–406. doi:10.1016/j.molimm.2009.08.033.

- Chen, Y., T. Maguire, R. E. Hileman, J. R. Fromm, J. D. Esko, R. J. Linhardt, and R. M. Marks. "Dengue Virus Infectivity Depends on Envelope Protein Binding to Target Cell Heparan Sulfate." *Nature Medicine* 3, no. 8 (August 1997): 866–71.
- Chee, Hui-Yee, and Sazaly AbuBakar. "Identification of a 48kDa Tubulin or Tubulin-like C6/36 Mosquito Cells Protein That Binds Dengue Virus 2 Using Mass Spectrometry." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320, no. 1 (July 16, 2004): 11–17. doi:10.1016/j.bbrc.2004.05.124.
- Chavez-Salinas, Salvador, Ivonne Ceballos-Olvera, Jorge Reyes-Del Valle, Fernando Medina, and Rosa M. Del Angel. "Heat Shock Effect upon Dengue Virus Replication into U937 Cells." *Virus Research* 138, no. 1–2 (December 2008): 111–18. doi:10.1016/j.virusres.2008.08.012.
- Cervantes-Salazar, Margot, Antonio H. Angel-Ambrocio, Ruben Soto-Acosta, Patricia Bautista-Carbajal, Arianna M. Hurtado-Monzon, Sofia L. Alcaraz-Estrada, Juan E. Ludert, and Rosa M. Del Angel. "Dengue Virus NS1 Protein Interacts with the Ribosomal Protein RPL18: This Interaction Is Required for Viral Translation and Replication in Huh-7 Cells." *Virology* 484 (June 16, 2015): 113–26. doi:10.1016/j.virol.2015.05.017.
- Ceballos-Olvera, Ivonne, Salvador Chávez-Salinas, Fernando Medina, Juan E. Ludert, and Rosa M. del Angel. "JNK Phosphorylation, Induced during Dengue Virus Infection, Is Important for Viral Infection and Requires the Presence of Cholesterol." *Virology* 396, no. 1 (January 5, 2010): 30–36. doi:10.1016/j.virol.2009.10.019.
- Callahan, J. D., S. J. Wu, A. Dion-Schultz, B. E. Mangold, L. F. Peruski, D. M. Watts, K. R. Porter, et al. "Development and Evaluation of Serotype- and Group-Specific Fluorogenic Reverse Transcriptase PCR (TaqMan) Assays for Dengue Virus." *Journal of Clinical Microbiology* 39, no. 11 (November 2001): 4119–24. doi:10.1128/JCM.39.11.4119-4124.2001.
- Brunetti, Jesús E., Luis A. Scolaro, and Viviana Castilla. "The Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K (hnRNP K) Is a Host Factor Required for Dengue Virus and Junin Virus Multiplication." *Virus Research* 203 (May 4, 2015): 84–91. doi:10.1016/j.virusres.2015.04.001.
- Bressanelli, Stéphane, Karin Stiasny, Steven L Allison, Enrico A Stura, Stéphane Duquerroy, Julien Lescar, Franz X Heinz, and Félix A Rey. "Structure of a Flavivirus Envelope Glycoprotein in Its Low-pH-Induced Membrane Fusion Conformation." *The EMBO Journal* 23, no. 4 (February 25, 2004): 728–38. doi:10.1038/sj.emboj.7600064.
- Blaney, Joseph E., Jennifer M. Matro, Brian R. Murphy, and Stephen S. Whitehead. "Recombinant, Live-Attenuated Tetravalent Dengue Virus Vaccine Formulations Induce a Balanced, Broad, and Protective Neutralizing Antibody Response against Each of the Four Serotypes in Rhesus Monkeys." *Journal of Virology* 79, no. 9 (May 2005): 5516–28. doi:10.1128/JVI.79.9.5516-5528.2005.
- Blackwell, J. L., and M. A. Brinton. "Translation Elongation Factor-1 Alpha Interacts with the 3' Stem-Loop Region of West Nile Virus Genomic RNA." *Journal of Virology* 71, no. 9 (September 1997): 6433–44.
- Bhuvanakantham, Raghavan, Mun-Keat Chong, and Mah-Lee Ng. "Specific Interaction of Capsid Protein and Importin-Alpha/beta Influences West Nile Virus Production." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 389, no. 1 (November 6, 2009): 63–69. doi:10.1016/j.bbrc.2009.08.108.
- Bhavsar, Rital B., Leah N. Makley, and Panagiotis A. Tsonis. "The Other Lives of Ribosomal Proteins." *Human Genomics* 4, no. 5 (June 2010): 327–44.
- Avirutnan, Panisadee, Nuntaya Punyadee, Sansanee Noisakran, Chulaluk Komoltri, Somchai Thiemmecca, Kusuma Auethavornanan, Aroonroong Jairungsri, et al. "Vascular Leakage in Severe Dengue Virus Infections: A Potential Role for the Nonstructural Viral Protein NS1

and Complement." *The Journal of Infectious Diseases* 193, no. 8 (April 15, 2006): 1078–88. doi:10.1086/500949.

Alcaraz-Estrada, Sofia Lizeth, Martha Yocupicio-Monroy, and Rosa María del Angel. "Insights into Dengue Virus Genome Replication." *Future Virology* 5, no. 5 (September 1, 2010): 575–92. doi:10.2217/fvl.10.49.

XI. APÉNDICE

SOLUCIONES PARA GELES DE POLIACRILAMIDA

Acrilamida al 30%/ bis-acrilamida al 0.8%

Acrilamida 29.2 g

Bis-acrilamida 0.8 g

Disolver en 50 ml de agua destilada y aforar a 100 ml.

Filtrar a través de poro 0.22 μ .

Tris-HCl pH 8.8 (solución B)

Tris-base (sigma) 12.11 g

Disolver en 50 ml de agua destilada y ajustar el pH a 8.8 con HCl, aforar esta solución a 100ml para ser filtrada con poro 0.22 μ y ser guardada a 4°C.

Tris-HCl pH 6.8 (solución D)

Tris-base (sigma) 12.11 g

Disolver en 50 ml de agua destilada y ajustar el pH a 6.8 con HCl, aforar esta solución a 100ml para ser filtrada con poro 0.22 μ y ser guardada a 4°C.

Persulfato de amonio 10X

1 g de persulfato de amonio

Disuelto en 10 ml de agua destilada.

SDS al 2%

2 g de SDS (sigma) disuelto en 100 ml de agua destilada.

TEMED (Bio-Rad)

16.6 µl para un gel de 10ml al 10%

Buffer de muestra 2X (buffer de carga)

Agua	1.4 ml
Tris ph 6.8	1 ml
SDS al 10 %	2ml
Glicerol al 100 %	5 ml
B-mercaptoetanol	500µl
Azul de bromofenol	100µl

Buffer de muestra 5X (buffer de carga)

Tris ph 6.8	2.5 ml
SDS al 10 %	4 ml
Glicerol al 100 %	2 ml
B-mercaptoetanol	1 ml
Azul de bromofenol	500 µl

Amortiguador de electroforesis 10X (stock)

Glicina grado USP (sigma)	144 g
Tris-base (sigma)	30g
SDS (sigma)	10g

Disolver en 500 ml de agua destilada y aforar a 1 litro de la misma.

Amortiguador de electroforesis 1X

Amortiguador de electroforesis 10X (stock) 100ml

Agua destilada 900 ml

Solución colorante para geles (Azul brillante de Coomassie R250)

Azul brillante de Coomassie R250	0.3 g
Ácido acético	50 ml
Agua destilada	200 ml
metanol	250ml

Disolver y guardar a temperatura ambiente protegido de la luz.

Solución decolorante de geles de poliacrilamida

Metanol	165 ml
Ácido acético glacial	50 ml
Agua destilada	785 ml

Se guarda a temperatura ambiente.

Solución de secado para geles de poliacrilamida

Metanol	40ml
Glicerol	10ml
Acido acético glacial	7.5ml
Agua destilada	57.5 ml

SOLUCIONES DE TRANSFERENCIA

Buffer para transferir en cámara semi-seca

Tris-base (sigma)	5.8 g
Glicina grado USP (sigma)	29 g
SDS (sigma)	1 g
Metanol al 100%	200 ml
Agua destilada	800 ml

Buffer para transferir en cámara húmeda

Tris-base (sigma)	3.027
	g
Glicina grado USP (sigma)	14.14
	g
Metanol al 100%	200 ml
SDS	1g
Agua destilada	800 ml

PBS 1X

NaCl	8 g
KCl	0.7 g
Na ₂ HPO ₄	2.17 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g

Se afora a 800 ml con agua bidestilada y se ajusta el pH a 7.4 con NaOH o HCl, posteriormente se afora a 1 litro.

PBS 1X- Triton X.100 al 0.5%

NaCl	8 g
KCl	0.7 g
Na ₂ HPO ₄	2.17 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Triton X-100	5mL

Se afora a 800 ml con agua bidestilada y se ajusta el pH a 7.4 con NaOH o HCl, posteriormente se afora a 1 litro.

SOLUCIONES PARA PROTEINAS RECOMBINATES

IPTG 1M

IPTG	1 g
Agua miliQ	4.19 ml

Buffer de lisis bacteriana

Tris pH 8.0 50 mM	500µl
NaCl 300 mM	3 ml
Glicerol	1ml
Triton X-100	100µl

Aforar a 10 ml de agua destilada y filtrar con poro 0.22µ.

Buffer A (para purificar proteínas recombinante)

Tris pH. 8	25 ml
NaCl 1M	250 ml
Triton X-100	0.5 ml
Glicerol	50 ml
Etanol	50 ml
Agua	124.5 ml

SOLUCIONES PARA CULTIVO DE BACTERIAS

Ampicilina 100 mg/mL

Ampicilina	1 g
Agua	5ml

Disolver con NaOH y aforar a 10 ml.

Medio LB con ampicilina

Medio Luria Broth	25 g
Agua destilada	1 L
Ampicilina 100mg/ml	1ml

Disolver y esterilizar en autoclave, guardar a temperatura ambiente.

Agar LB

Medio Luria Broth	12.5 g
Agua destilada	500 ml
Agar	8 g

Glucosa 1 M

Glucosa	1 g
Agua destilada	5ml

SOLUCIONES PARA EXTRACTOS CELULARES

Solución de despegado

Tris HCl pH 7.5	2 ml a 1M
EDTA	0.1 ml a 0.5 M
NaCl	7.5 ml a 1M

Aforar a 50 ml y filtrar con poro 0.22 μ , guardar a temperatura ambiente.

Solución A para extractos citoplásmicos

Hepes	2 ml	a 0.5 M
MgCl ₂	0.15 ml	a 1 M
KCl	0.33 ml	a 3M

Aforar a 100 ml y filtrar con poro de 0.22 μ , se guarda a temperatura ambiente.

Solución C

Tris pH 8	0.05 ml	a 1 M
MgCl ₂	0.025 ml	a 1M
KCl	0.016 ml	a 3M
EGTA	7.5 µl	a 200 mM
DTT	2.5 µl	a 1 M
Glucosa	7.5 µl	a 1M
ZnCl ₂	0.01 ml	a 1 M

Aforar a 5ml y filtrar con poro 0.2 2 µm, se guarda a temperatura ambiente.

Solución D

Tris pH 8	0.1 ml	a 1 M
MgCl ₂	0.025 ml	a 1M
KCl	0.53 ml	a 3M
EGTA	5 µl	a 200 mM
DTT	2.5 µl	a 1 M
ZnCl ₂	0.01 ml	a 1 M

Aforar a 5 ml y filtrar con poro 0.2 2 µm, se guarda a temperatura ambiente.

SOLUCIONES PARA INMUNOFLUORESCENCIAS

Solución de trabajo

PBS 1 X

1% de suero fetal bovino

20 mg/mL de saponina

Formaldehído 1%

1 mL de formaldehído a 37 %

10 mL de PBS 1X